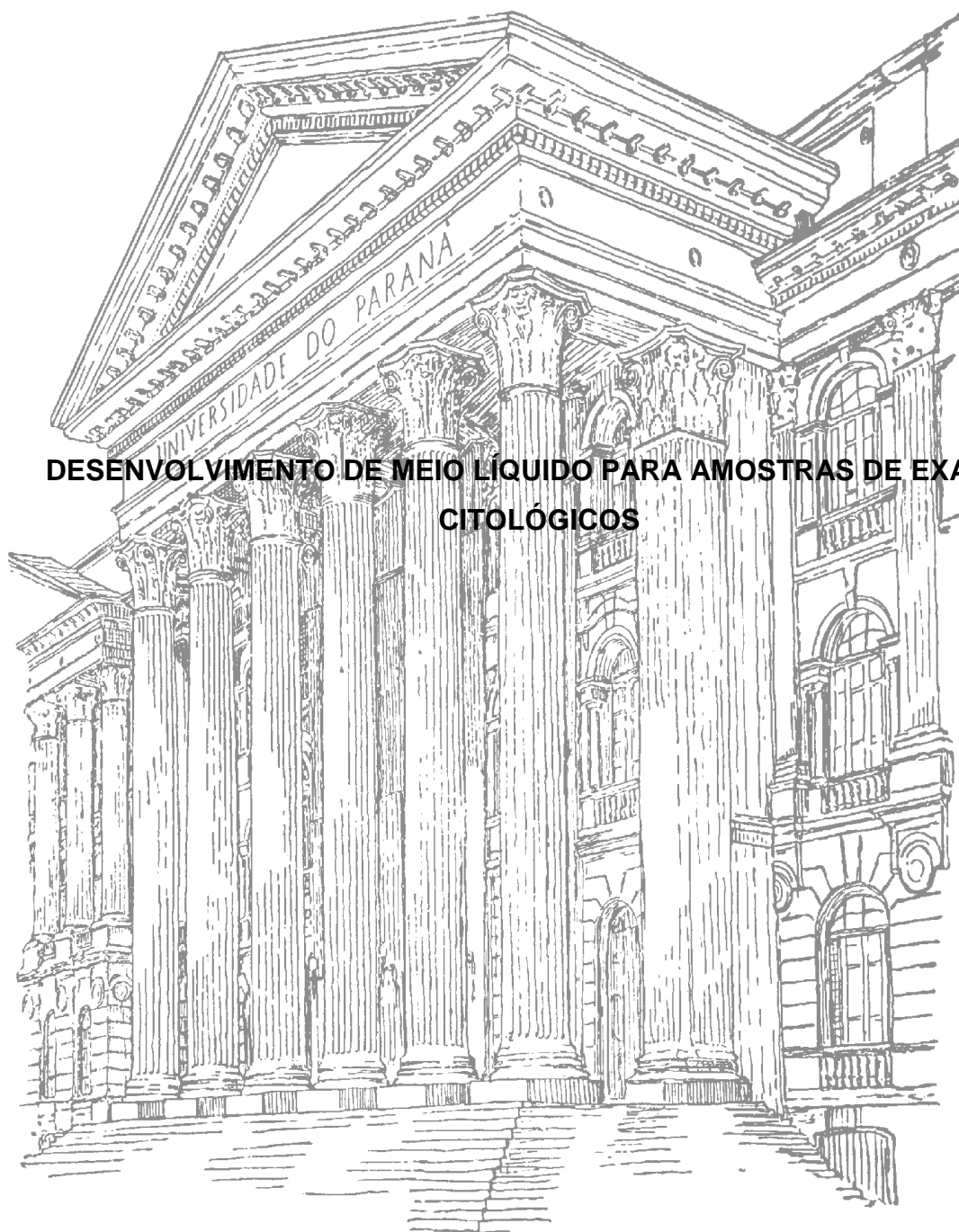


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**MICHELLI APARECIDA BERTOLAZO DA SILVA**



**DESENVOLVIMENTO DE MEIO LÍQUIDO PARA AMOSTRAS DE EXAMES  
CITOLÓGICOS**

**CURITIBA**

**2014**

**MICHELLI APARECIDA BERTOLAZO DA SILVA**

**DESENVOLVIMENTO DE MEIO LÍQUIDO PARA AMOSTRAS DE EXAMES  
CITOLÓGICOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora:  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Suely Soares Leonart

Coorientador:  
Prof. Dr. Sandro Germano

**CURITIBA**

**2014**

Silva, Michelli Aparecida Bertolazo da  
Desenvolvimento de meio líquido para amostras de exames citológicos /  
Michelli Aparecida Bertolazo da Silva – Curitiba, 2014.  
106 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Maria Suely Soares Leonart  
Coorientador: Professor Dr. Sandro Germano  
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do  
Paraná, 2014.

Inclui bibliografia

1. Citologia em meio líquido. 2. Papanicolaou. 3. Citologia cervicovaginal.  
I. Leonart, Maria Suely Soares. II. Germano, Sandro. III. Universidade  
Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 611.018

## TERMO DE APROVAÇÃO

**MICHELLI APARECIDA BERTOLAZO DA SILVA**

**Título: "DESENVOLVIMENTO DE MEIO LÍQUIDO PARA AMOSTRAS DE EXAMES CITOLÓGICOS"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.

Prof.ª Dra. Maria Suely Soares Leonart  
Orientadora

Prof.ª Dra. Aline Borsato Hauser  
Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. Alexandre Sherman Casimiro Onofre  
Universidade Federal de Santa Catarina

Curitiba, 28 de março de 2014.

## AGRADECIMENTOS

Em mais um dos grandes momentos da minha trajetória, sinto-me imensamente feliz em poder agradecer às pessoas que me ajudam a construir a minha (a nossa) história.

Só poderia iniciar os agradecimentos por meus pais.

Agradeço imensamente ao meu pai, Leonaldo, pela força e persistência desde o início da minha vida. Não estaria aqui hoje se não fosse por sua vontade, muitas vezes maior do que a minha, de que eu estudasse e ajudasse de alguma forma as pessoas. Agradeço por cada pedalada que você deu, em tempos difíceis, para me levar à escola. Essa conquista também é sua.

Agradeço à minha mãe, Bernardete, por ser tão generosa e amiga desde sempre e por saber ser doce comigo, mesmo nas horas em que estou mais amarga.

À minha irmã e melhor amiga, Nara, por ser a pessoa mais especial que conheço. Obrigada por comprar todos os meus medos, conflitos e frustrações; por se alegrar com a minha alegria e por me erguer quando eu preciso.

À minha orientadora e amiga, Maria Suely Soares, pessoa especial que pude conhecer desde a graduação e que me acolheu desde então com carinho maternal. Obrigada por dividir comigo seu conhecimento, sua experiência e seu dia-a-dia.

Ao meu coorientador, Sandro Germano, por estar sempre disposto a ajudar, pelas ótimas ideias e pela amizade sincera.

Ao meu namorado e amigo, William, por todas as etapas que fez questão de me ajudar a superar. Obrigada por ter sido amoroso, paciente, compreensivo e parceiro. Alguém que sentiu comigo todas as angústias de uma dissertação e, ainda assim, topou continuar, só pode ser mesmo o grande amor da minha vida.

Às minhas amigas Tary, Anna, Sil e Mirian, que depositam em mim uma confiança extrema, muito maior do que eu mereço. Agradeço por acreditarem em mim, por me amarem e por estarem ao meu lado desde quando já nem lembro mais.

Aos meus amigos de laboratório e de vida, Thiago, Vanessa, Andressa e Alline, pessoas especiais e nem um pouco comuns, que tive o prazer de conhecer nessa etapa e que pretendo continuar a conviver. Obrigada por dividirem comigo todas as alegrias, irritações e aventuras dessa fase.

À Irene, querida amiga, sempre disposta a ajudar e a bater um bom papo.

Ao professor Dr. Aguinaldo José do Nascimento, que colaborou com sugestões técnicas para a realização deste trabalho de forma generosa.

Ao professor Dr. Marco Antônio Zonta e à toda equipe do laboratório In Cito, que em muito contribuíram para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Clube de Mães União Vila Torres, em especial à Irenilda Arruda, pela parceria e auxílio à pesquisa.

A todos que, em um ato admirável de desprendimento e amor à Ciência, doaram material citológico para que a pesquisa pudesse ser realizada.

Enfim, agradeço a todos que ajudaram de alguma forma na realização desse trabalho.

## RESUMO

A importância da citologia clínica se relaciona com a sua eficácia em contribuir para o diagnóstico de várias doenças, em especial no rastreamento de lesões precursoras e na detecção de neoplasias de grande relevância em saúde pública. O emprego do exame de Papanicolaou foi pioneiro no rastreamento do câncer cervical, contribuindo de forma decisiva no controle desta doença. Estudos no sentido de aperfeiçoar o método têm levado ao desenvolvimento de meios líquidos para a preservação de células, alguns deles comercializados para a coleta, transporte e preparação de amostras de diferentes materiais citológicos. Há dificuldades, entretanto, em relação ao seu uso em programas de saúde pública, em função da disponibilidade de recursos. Neste trabalho, testou-se a adequabilidade de meios líquidos alternativos para o preparo de amostras para exames citológicos, obtidas de mucosa oral ou cervicovaginal de 50 estudantes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná e de mucosa cervicovaginal de 19 mulheres atendidas no Clube de Mães União Vila Torres, Curitiba-PR, os quais assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Após testes preliminares com 127 diferentes composições de meios líquidos, os meios IFP, composto por formaldeído 1 ml/dl, isopropanol 1 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L pH 7,4 e EtIFP, composto por etanol 20 ml/dl; formaldeído 1 ml/dl, isopropanol 1 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L, mostraram-se promissores para aprofundar os estudos. Ao se comparar amostras de células de mucosa cervical recentes e preservadas durante 3, 7 e 15 dias nos meios IFP e EtIFP com amostras de citologia convencional e amostras preservadas durante 15 dias em meio líquido comercial SurePath, observou-se similaridade em relação à: a) qualidade e adequabilidade das amostras; b) presença de tipos celulares, microrganismos e seus efeitos citopáticos; c) presença de alterações celulares reativas, degenerativas e displásicas. A partir dos resultados obtidos, pode-se sugerir que os meios líquidos IFP e EtIFP são adequados para o preparo de amostras citológicas após a preservação de células por até 15 dias, tanto de material obtido de mucosa oral quanto de mucosa cervicovaginal, sem diferenças relevantes entre ambos nos itens analisados. A partir das constatações feitas, pode-se sugerir a continuidade dos estudos com os meios IFP e EtIFP, bem como com outras formulações, buscando-se aprimorar a metodologia e estabelecer a sua eficácia na preservação de amostras citológicas.

Palavras-chave: citologia em meio líquido, Papanicolaou, citologia cervicovaginal

## ABSTRACT

The clinical importance of cytology relates to its effectiveness in contributing to the diagnosis diseases, especially in detecting neoplasms and their precursors lesions of great relevance in public health. The use of the Pap smear pioneered in cervical cancer screening, contributing decisively to control this disease. Studies on improving the method has led to the development of liquid-based for the preservation of cells, some of them sold for collection, transportation and preparation of samples of different cytological materials. There are difficulties, however, in relation to its use in public health programs, depending on resource availability. In this work, we tested the suitability of alternative liquid-based for the preparation of samples for cytological examination, obtained from oral or cervicovaginal mucosa of 50 students of the Graduate Course Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraná; and cervicovaginal mucosa of 19 women attended in the Mothers Club Union Torres Vila, Curitiba – PR - Brazil, which signed the Informed Consent Form. After preliminary tests with 127 different compositions of liquid-based in the preparation of cytologic samples and cervicovaginal and oral mucosa, the IFP means comprises formaldehyde 1 mL/L , isopropanol, 1 ml/dL and phosphate buffer 10 mmol/L pH 7.4 and EtIFP consisting of 20 ml ethanol/dl; 1 ml formaldehyde / dl , isopropanol, 1 ml / dL and phosphate buffer 10 mmol/l, proved promising for further studies . When comparing samples of recent cervicovaginal mucus cells and preserved for 3, 7 and 15 days in the liquid-baseds IFP and EtIFP with conventional cytology samples and the samples preserved for 15 days commercial SurePath liquid-based, we observed similarity regarding: a) quality and suitability of samples, b) presence of cell types, organisms and their cytopathic effects, c) presence of reactive , degenerative and dysplastic cellular changes . From the results obtained, it can be suggested that the liquid-based IFP and EtIFP are suitable for the preparation of cytologic specimens after preservation of cells for up to 15 days in material obtained from oral and cervicovaginal mucosas without relevant differences between both the items analyzed . From the findings, we can be suggest the continuation of studies with liquid-based IFP and EtIFP, as well as other formulations, seeking to improve the methodology and establish its effectiveness in preservation of cytologic samples.

Key words: liquid-based cytology, pap test, cervical cytology.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - INFECÇÃO PELO HPV E INTEGRAÇÃO DO GENOMA VIRAL AO GENOMA DA CÉLULA HOSPEDEIRA.....	21
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS GRAUS DE MATURAÇÃO DO EPITÉLIO ESTRATIFICADO ESCAMOSO VAGINAL E CERVICAL.....	27
FIGURA 3 - FLUXOGRAMA DOS TESTES PRELIMINARES EM CÉLULAS DE MUCOSA ORAL E CERVICOVAGINAL.....	40
FIGURA 4 - FLUXOGRAMA DOS TESTES DE ESTUDOS DE AMOSTRAS CITOLÓGICAS PRESERVADAS EM MEIOS LÍQUIDOS IFP E ETIFP EM COMPARAÇÃO A AMOSTRAS DE CITOLOGIA CONVENCIONAL E DE CITOLOGIA EM MEIO LÍQUIDO COMERCIAL SUREPATH.....	49
FIGURA 5 - FOTOMICROGRAFIAS DE CÉLULAS DE MUCOSA ORAL APÓS 3, 5 e 10 DIAS DE CONSERVAÇÃO NOS MEIO LÍQUIDOS 1, 29 e 55....	58
FIGURA 6 - AVALIAÇÃO DA ADEQUABILIDADE DE AMOSTRAS CITOLÓGICAS DE MUCOSA CERVICOVAGINAL POR CITOLOGIA CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU, EM MEIO LÍQUIDO COMERCIAL SUREPATH (BD) APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO E NO MEIO LÍQUIDO IFP NOS TEMPOS ZERO E DE 3, 7 E 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO.....	62
FIGURA 7 - AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE AMOSTRAS CITOLÓGICAS DE MUCOSA CERVICOVAGINAL POR CITOLOGIA CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU, EM MEIO LÍQUIDO COMERCIAL SUREPATH (BD) APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO E NO MEIO LÍQUIDO IFP NOS TEMPOS ZERO E DE 3, 7 E 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO.....	63
FIGURA 8 - AVALIAÇÃO DA ADEQUABILIDADE DE AMOSTRAS CITOLÓGICAS DE MUCOSA CERVICOVAGINAL POR CITOLOGIA CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU, EM MEIO LÍQUIDO COMERCIAL SUREPATH (BD) APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO E NO MEIO LÍQUIDO EtIFP NOS TEMPOS ZERO E DE 3, 7 E 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO.....	64

- FIGURA 9 - AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE AMOSTRAS CITOLÓGICAS DE MUCOSA CERVICOVAGINAL POR CITOLOGIA CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU, EM MEIO LÍQUIDO COMERCIAL SUREPATH (BD) APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO E NO MEIO LÍQUIDO ETIFP NOS TEMPOS ZERO E DE 3, 7 E 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO.....65
- FIGURA 10 - PRESENÇA DE TIPOS CELULARES DA MUCOSA CERVICAL E DE LEUCÓCITOS POLIMORFONUCLEARES, HISTIÓCITOS E HEMÁCIAS EM AMOSTRAS DE MATERIAL CERVICOVAGINAL NO MÉTODO CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU E NO TEMPO ZERO E APÓS 3, 7 E 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO NO MEIO LÍQUIDO IFP.....66
- FIGURA 11 - PRESENÇA DE TIPOS CELULARES DA MUCOSA CERVICAL E DE LEUCÓCITOS POLIMORFONUCLEARES, HISTIÓCITOS E HEMÁCIAS EM AMOSTRAS DE MATERIAL CERVICOVAGINAL NO MÉTODO CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU E NO TEMPO ZERO E APÓS 3, 7 E 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO NO MEIO LÍQUIDO ETIFP.....67
- FIGURA 12 - PRESENÇA DE TIPOS CELULARES DA MUCOSA CERVICAL E DE LEUCÓCITOS POLIMORFONUCLEARES, HISTIÓCITOS E HEMÁCIAS EM AMOSTRAS DE MATERIAL CERVICOVAGINAL: (A) APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO NO MEIO LÍQUIDO IFP E APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO NO MEIO LÍQUIDO SUREPATH (BD) (B) APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO NO MEIO LÍQUIDO ETIFP E APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO NO MEIO LÍQUIDO SUREPATH (BD).....68
- FIGURA 13 - PRESENÇA DE TIPOS CELULARES DA MUCOSA CERVICAL E DE LEUCÓCITOS POLIMORFONUCLEARES, HISTIÓCITOS E HEMÁCIAS EM AMOSTRAS DE MATERIAL CERVICOVAGINAL NO TEMPO ZERO E APÓS 3, 7 E 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO NO MEIO LÍQUIDO IFP E ETIFP.....68
- FIGURA 14 - FOTOMICROGRAFIAS DE TIPOS CELULARES OBSERVADOS EM MATERIAL CITOLÓGICO CERVICOVAGINAL PELA METODOLOGIA CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU, EM MEIO LÍQUIDO COMERCIAL SUREPATH (BD) APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO

CELULAR E NO MEIO LÍQUIDO IFP, APÓS 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO CELULAR.....	69
FIGURA 15 - FOTOMICROGRAFIAS DE TIPOS CELULARES OBSERVADOS EM MATERIAL CITOLÓGICO CERVICOVAGINAL PELA METODOLOGIA CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU, EM MEIO LÍQUIDO COMERCIAL SUREPATH (BD) APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO CELULAR E NO MEIO LÍQUIDO EtIFP, APÓS 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO CELULAR.....	70
FIGURA 16 - PRESENÇA DE MICRORGANISMOS EM MATERIAL CITOLÓGICO DE MUCOSA CERVICAL EM: (A) MÉTODO CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU E NO TEMPO ZERO, APÓS 3, 7 E 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO IFP; (B) APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO NO MEIO LÍQUIDO IFP E APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO NO MEIO LÍQUIDO SUREPATH (BD).....	71
FIGURA 17 - PRESENÇA DE MICRORGANISMOS EM MATERIAL CITOLÓGICO DE MUCOSA CERVICAL EM: (A) MÉTODO CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU E NO TEMPO ZERO, APÓS 3, 7 E 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO ETIFP; (B) APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO NO MEIO LÍQUIDO ETIFP E APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO NO MEIO LÍQUIDO SUREPATH (BD).....	72
FIGURA 18 - FOTOMICROGRAFIAS DE MICRORGANISMOS OBSERVADOS EM MATERIAL CITOLÓGICO CERVICOVAGINAL PELA METODOLOGIA CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU, EM MEIO LÍQUIDO COMERCIAL SUREPATH (BD), APÓS 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO E EM MEIO LÍQUIDO IFP APÓS 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO.....	73
FIGURA 19 - FOTOMICROGRAFIAS DE MICRORGANISMOS OBSERVADOS EM MATERIAL CITOLÓGICO CERVICOVAGINAL PELA METODOLOGIA CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU, EM MEIO LÍQUIDO COMERCIAL SUREPATH (BD), APÓS 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO E EM MEIO LÍQUIDO ETIFP APÓS 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO.....	74
FIGURA 20 - ALTERAÇÕES CITOLÓGICAS EM ESFREGAÇOS CERVICOVAGINAIS CLASSIFICADOS COMO ASC-H, NILM E LSIL, PELAS METODOLOGIAS CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU, MEIO LÍQUIDO SUREPATH APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO E	

MEIO LÍQUIDO IFP APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO CELULAR,  
RESPECTIVAMENTE.....77

FIGURA 21 - ALTERAÇÕES CITOLÓGICAS EM ESFREGAÇOS  
CERVICOVAGINAIS CLASSIFICADOS COMO LSIL, PELAS  
METODOLOGIAS CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU, MEIO  
LÍQUIDO SUREPATH APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO E MEIO  
LÍQUIDO IFP APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO  
CELULAR.....78

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1: PRESENÇA DE ALTERAÇÕES REATIVAS, REPARATIVAS, DEGENERATIVAS, PRÉ-NEOPLÁSICAS E NEOPLÁSICAS EM CÉLULAS DE MATERIAL CERVICOVAGINAL NO MÉTODO CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU, NO MEIO LÍQUIDO SUREPATH (BD) APÓS 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO E MEIO LÍQUIDO IFP NO TEMPO ZERO E APÓS 3, 7 E 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO..... 75
- TABELA 2: PRESENÇA DE ALTERAÇÕES REATIVAS, REPARATIVAS, DEGENERATIVAS, PRÉ-NEOPLÁSICAS E NEOPLÁSICAS EM CÉLULAS DE MATERIAL CERVICOVAGINAL NO MÉTODO CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU E NO TEMPO ZERO E APÓS 3, 7 E 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO NO MEIO LÍQUIDO ETIFP.....76
- TABELA 3: RESULTADOS DAS LEITURAS DAS LÂMINAS DE MATERIAL CÉRVICO-VAGINAL NO MÉTODO DE PAPANICOLAOU, NO MEIO LÍQUIDO COMERCIAL SUREPATH APÓS 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO E NO MEIO LÍQUIDO IFP NO TEMPO 0 E APÓS 3, 7 E 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO..... 76
- TABELA 4: RESULTADOS DAS LEITURAS DAS LÂMINAS DE MATERIAL CÉRVICO-VAGINAL NO MÉTODO DE PAPANICOLAOU, NO MEIO LÍQUIDO COMERCIAL SUREPATH APÓS 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO E NO MEIO LÍQUIDO ETIFP NO TEMPO 0 E APÓS 3, 7 E 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO.....77

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - NOMENCLATURA BRASILEIRA PARA LAUDOS CITOPATOLOGICOS CERVICAIS.....	33
QUADRO 2 – COMPOSIÇÕES DE MEIOS LÍQUIDOS A SEREM TESTADOS PRELIMINARMENTE PARA ESTUDOS CITOLÓGICOS EM MATERIAL DE MUCOSA ORAL.....	42
QUADRO 3 - COLORAÇÃO SEGUNDO PAPANICOLAOU MODIFICADA.....	46
QUADRO 4 – COMPOSIÇÕES DE MEIOS LÍQUIDOS A SEREM TESTADOS PRELIMINARMENTE PARA ESTUDOS CITOLÓGICOS EM MATERIAL DE MUCOSA CERVICOVAGINAL.....	47
QUADRO 5 - TESTES PRELIMINARES: AVALIAÇÃO DA ADEQUABILIDADE DE AMOSTRAS CITOLÓGICAS DE MUCOSA ORAL APÓS 3, 5 e 10 DIAS DE CONSERVAÇÃO NOS MEIOS LÍQUIDOS 1,10, 23, 26, 29, 32, 55 ou 56, EM COMPARAÇÃO À CITOLOGIA CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU DE CADA BATERIA CORRESPONDENTE AOS EXPERIMENTOS.....	55
QUADRO 6 - TESTES PRELIMINARES: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE CITOLÓGICA DE AMOSTRAS DE MUCOSA ORAL APÓS 3 DIAS DE CONSERVAÇÃO NOS MEIOS LÍQUIDOS 1,10, 23, 26, 29, 32, 55, 56, EM COMPARAÇÃO À CITOLOGIA CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU DE CADA BATERIA CORRESPONDENTE AOS EXPERIMENTOS.....	56
QUADRO 7 – TESTES PRELIMINARES: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE CITOLÓGICA DE AMOSTRAS DE MUCOSA ORAL APÓS 5 DIAS DE CONSERVAÇÃO NOS MEIOS LÍQUIDOS 1, 10, 23, 26, 29, 32, 55, EM COMPARAÇÃO À CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU DE CADA BATERIA CORRESPONDENTE AOS EXPERIMENTOS.....	57
QUADRO 8 - TESTES PRELIMINARES: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE CITOLÓGICA DE AMOSTRAS DE MUCOSA ORAL APÓS 10 DIAS DE CONSERVAÇÃO NOS MEIOS LÍQUIDOS 1, 29 e 55, EM COMPARAÇÃO À CITOLOGIA CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU.....	57

QUADRO 9 - TESTES PRELIMINARES: AVALIAÇÃO DA ADEQUABILIDADE DE AMOSTRAS CITOLÓGICAS DE MUCOSA CÉRVICO-VAGINAL APÓS 3 DIAS DE CONSERVAÇÃO NOS MEIOS LÍQUIDOS 1, 29, 55, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126 E 127.....	59
---	----

QUADRO 10 - TESTES PRELIMINARES: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE CITOLÓGICA DE AMOSTRAS DE MUCOSA CÉRVICO-VAGINAL APÓS 3 DIAS DE CONSERVAÇÃO NOS MEIOS LÍQUIDOS 1, 29, 55, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126 e 127.....	60
--	----

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	20
2.1 CÂNCER .....	20
2.1.1 Câncer de Colo de Útero.....	20
2.1.2 Câncer de Boca.....	22
2.2 O EXAME CITOLÓGICO NO DIAGNÓSTICO DE CÂNCER E DE MICRORGANISMOS PATOLÓGICOS.....	23
2.2.1 Citologia Cervicovaginal .....	23
2.2.2 Citologia Oral .....	27
2.2.3 Alterações de Mucosa Vaginal e Mucosa Oral Associadas a Microrganismos.....	28
2.3 RASTREAMENTO DO CÂNCER DE COLO DE ÚTERO .....	29
2.3.1 Sistema Bethesda de Classificação para Citopatologia Cervicovaginal .....	30
2.3.2 Nomenclatura Brasileira para Laudos Citopatológicos Cervicais .....	33
2.3.3 Adesão ao Exame de Papanicolaou.....	34
2.4 CITOLOGIA EM MEIO LÍQUIDO.....	34
3 OBJETIVOS .....	37
3.1 OBJETIVO GERAL .....	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	38
4.1 MATERIAL.....	38
4.1.1 Reagentes, Material de Consumo e Equipamentos Utilizados .....	38
4.1.2 Material citológico .....	38
4.2 MÉTODOS .....	39
4.2.1 Recrutamento de Voluntários e Coleta de Material .....	39
4.2.2 Testes Preliminares .....	40
4.2.2.1 Testes preliminares com material citológico de boca .....	41
4.2.2.1.1 Coleta de material citológico de boca .....	44
4.2.2.1.2 Processamento de material.....	44
4.2.2.1.3 Análises citológicas.....	45
4.2.2.2 Testes preliminares com material citológico cervicovaginal .....	46
4.2.2.2.1 Coleta do material citológico cervicovaginal .....	47
4.2.2.2.2 Processamento das amostras .....	48
4.2.2.2.3 Análises citológicas.....	48
4.2.3 Estudo de Amostras Citológicas Cervicovaginais Preservadas em Meios Líquidos IFP e EtIFP em Comparação a Amostras de Citologia Convencional e de Citologia em Meio Líquido Comercial SurePath (BD) .....	48
4.2.3.1 Coleta, processamento e análise das amostras citológicas cervicovaginais.....	49
4.2.3.2 Análises citológicas .....	50
4.2.3.2.1 Adequação da Amostra .....	51
4.2.3.2.2 Tipos celulares .....	51



4.2.3.2.3 Presença de microrganismos .....	51
4.2.3.2.4 Alterações reativas, reparativas, degenerativas, pré-neoplásicas e neoplásicas.....	52
4.2.3.3 Elaboração de laudos citológicos.....	52
4.2.4 Análise Estatística .....	52
4.2.5 Seguimento das Voluntárias .....	53
5 RESULTADOS .....	54
5.1 TESTES PRELIMINARES COM CÉLULAS DE MUCOSA ORAL .....	54
5.2 TESTES PRELIMINARES COM CÉLULAS DE MUCOSA CERVICOVAGINAL.....	58
5.3 ESTUDO DE AMOSTRAS CITOLÓGICAS CERVICOVAGINAIS PRESERVADAS EM MEIOS LÍQUIDOS IFP E ETIFP EM COMPARAÇÃO A AMOSTRAS DE CITOLOGIA CONVENCIONAL E DE CITOLOGIA EM MEIO LÍQUIDO COMERCIAL SUREPATH (BD).....	61
6 DISCUSSÃO .....	79
7. CONCLUSÕES .....	90
8 REFERÊNCIAS.....	91
ANEXOS.....	100

## 1 INTRODUÇÃO

Os casos de câncer vêm aumentando no mundo e atualmente são responsáveis pelo óbito de aproximadamente oito milhões de pessoas ao ano (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC, 2014). O diagnóstico na fase não invasiva do câncer de colo do útero em mulheres, geralmente assintomáticas, é possível graças à lenta evolução deste tipo de câncer, possibilitando que lesões intraepiteliais escamosas de alto grau, quando o tratamento é necessário, apresentem elevado percentual de cura (BRENNAN *et al.*, 2001). No exame citológico, pode-se sugerir a presença de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, bem como de microrganismos patogênicos ou de seus efeitos citopáticos, auxiliando assim no diagnóstico de doenças sexualmente transmissíveis (DST). A presença de efeitos citopáticos específicos do Papilomavírus humano (HPV) sugere a ocorrência de lesões pré-neoplásicas, classificadas como lesões de baixo grau (MACHADO *et al.*, 2008; LEVI *et al.*, 2011). Assim, a citologia cervicovaginal, utilizada há mais de cinquenta anos, é comprovadamente uma ferramenta contra o câncer cervical (MONSONEGO *et al.*, 2000).

Também para prevenção e detecção de lesões orais, é possível realizar exames de citologia esfoliativa. Na boca, o HPV está associado a papiloma escamoso oral, condiloma acuminado, verruga vulgar e hiperplasia epitelial, sendo também considerado agente etiológico de alguns carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (EDRIS *et al.*, 2010; FERRARO *et al.*, 2011).

A área de Análises Clínicas compreende um rol de procedimentos laboratoriais com ferramentas importantes no auxílio ao diagnóstico e detecção de processos patológicos precoces, incluindo o exame microscópico de células descamadas obtidas por esfoliação ou punção. Devido à rotina clínica e laboratorial, por vezes há dificuldades em se avaliar o material em curto prazo. Assim, há necessidade de preservar determinadas amostras, para que não percam características citológicas importantes na avaliação ao microscópio. A situação ideal seria o emprego de meios conservantes que permitissem a avaliação diagnóstica em amostras citológicas com a morfologia preservada e fundo limpo, sem excesso de muco, hemorragia ou infiltrado inflamatório, além de permitir a realização de outros testes (SIEBERS *et al.*, 2012). Com o desenvolvimento de uma técnica de coleta e preparo de amostras em meio líquido, o material colhido pode ser mantido em um

líquido conservante e avaliado também por outros métodos, tais como: imunocitoquímica, biologia molecular e citometria de fluxo (KARNON, *et al.*, 2004; LONGATTO-FILHO *et al.*, 2005).

Vários estudos apontam para vantagens da técnica de citologia em meio líquido em comparação ao método convencional pela melhor representatividade do material coletado, menor número de casos de ressecamento ou má distribuição das células no esfregaço, menor quantidade de resultados falso-negativos e de esfregaços insatisfatórios, além da presença da totalidade do material coletado no líquido fixador, possibilitando a realização de testes histoquímicos e de biologia molecular com o mesmo material, quando necessários (DOYLE *et al.*, 2006; ZHU *et al.*, 2007) A técnica de citologia em meio líquido tem sido aplicada com bons resultados para avaliar células de material pulmonar, urinário, oral, de efusões serosas, entre outros (LAUCIRICA *et al.*, 2010; EDRIS *et al.*, 2011; COLLINS *et al.*, 2012).

A elevação dos custos com o uso de meio líquido é uma das desvantagens do método e um fator limitante para sua utilização em larga escala no rastreamento de lesões pré-cancerosas (MACHADO *et al.*, 2008). Assim, há necessidade de estudos na tentativa de desenvolver alternativas satisfatórias e mais acessíveis, tendo em vista o melhoramento do método convencional de Papanicolaou.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CÂNCER

Câncer é a denominação de um grupo de doenças que têm em comum o descontrole no crescimento de células, as quais são capazes de invadir tecidos e órgãos com características de malignidade, podendo se espalhar para outras regiões do corpo, pelo mecanismo de metástase. Um tumor benigno é uma massa restrita de células que se multiplicam, as quais são semelhantes ao seu tecido original, raramente oferecendo risco de vida. Os cânceres que se originam em tecidos epiteliais são denominados carcinomas, e os de tecidos conjuntivos, sarcomas (BRASIL/ MINISTÉRIO DA SAÚDE - MS, 2014).

O acúmulo de alterações espontâneas ou induzidas na estrutura ou expressão de determinados genes podem causar o desenvolvimento do câncer. Mutações genéticas ocorrem continuamente e são reparadas por mecanismos de defesa celular, que exercem controle sobre crescimento, latência e a apoptose celular. A presença de falhas no mecanismo de defesa, herdadas ou geradas por mutações, possibilita a reprodução de clones de células resistentes à indução para a fase de latência, ou à apoptose e ao controle de crescimento, podendo originar o desenvolvimento de neoplasias. A exposição do epitélio a um agente agressor pode resultar em dano genético, muitas vezes associado à lesão celular crônica, cuja ação constante pode resultar na transformação celular maligna (MIRANDA *et al.*, 2003).

#### 2.1.1 Câncer de Colo de Útero

O câncer de colo de útero é considerado um problema de saúde pública em países em desenvolvimento, os quais apresentam cerca de 80% das taxas de óbitos por essa neoplasia. Mundialmente, o câncer cervical constitui o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres, principalmente na faixa etária reprodutiva (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009; MEIRA *et al.*, 2010; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER –IARC, 2014).

O câncer de colo de útero é o segundo tumor mais frequente na população feminina brasileira, atrás apenas do câncer de mama, bem como a quarta causa de morte de mulheres por câncer no Brasil. Para o ano de 2014, a estimativa é de cerca de 15.600 novos casos e o número de vítimas fatais em 2011 foi de cerca de 5.200 (BRASIL/ MS, 2014).

O desenvolvimento do câncer cervical está relacionado com a infecção por Papilomavirus Humano (HPV), a qual é necessária para o desenvolvimento da doença. No entanto, existe um componente multifatorial na patogenia dessa doença, como múltiplos parceiros sexuais, multiparidade, início precoce de atividade sexual e tabagismo (BRENNA *et al.*, 2001; ROSA *et al.*, 2009; MOORE *et al.*, 2012).

A infecção pelo HPV ocorre através de microfissuras na camada basal do epitélio (Figura 1), com entrada do vírus na célula e chegada ao núcleo, onde acontece a replicação viral juntamente com a replicação celular. O vírus se integra ao genoma da célula hospedeira e impede a parada da divisão celular, culminando em perda do controle do ciclo celular. A evolução do processo pode gerar um tecido neoplásico, no qual se desenvolvem células malignas, que podem invadir vasos sanguíneos e linfáticos, caracterizando metástase. A progressão do processo de crescimento e malignização é geralmente lenta. A partir de uma lesão precursora, o desenvolvimento do câncer leva cerca de 5 a 15 anos. Dessa forma, é possível que se promova a prevenção desse tipo de neoplasia, uma vez que se pode localizar e tratar lesões pré-neoplásicas (NARAYAN e MURTY, 2010; VIDAL *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2013).

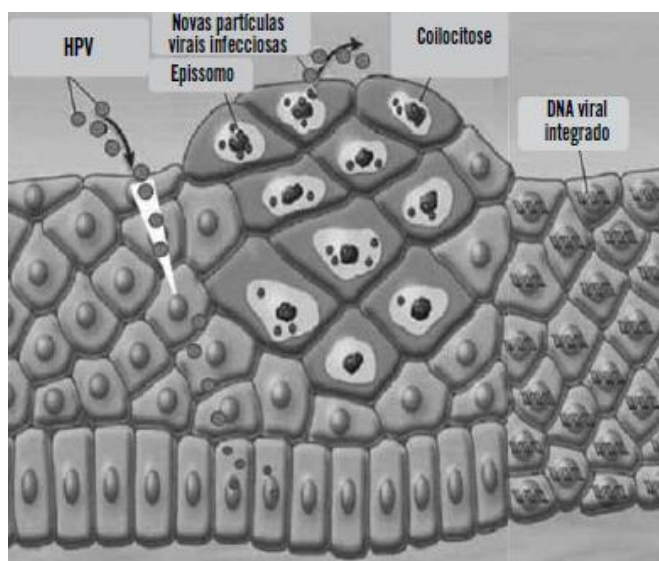


FIGURA 1 - INFECÇÃO PELO HPV E INTEGRAÇÃO DO GENOMA VIRAL AO GENOMA DA CÉLULA HOSPEDEIRA. FONTE: FERRARO *et al.*, 2011.

### 2.1.2 Câncer de Boca

A incidência mundial do câncer bucal estimada em 2012 foi de aproximadamente 300 mil casos e cerca de 140 mil óbitos (IARC, 2014). No Brasil, o câncer de boca apresenta estimativas de aproximadamente 15 mil novos casos em 2014, com maior incidência em homens. A mortalidade no ano de 2010 foi de aproximadamente 5 mil casos (BRASIL/ MS, 2014).

A causa da carcinogênese oral é multifatorial, com interação de fatores envolvidos com processos de controle de proliferação celular aliados a fatores de origem extrínseca relacionados com a interação das células e o ambiente, tais como tabagismo, etilismo, exposição prolongada a radiações solares, dieta, microrganismos e deficiência imunológica (LIMA *et al.*, 2005; BRENER *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2012).

A mucosa bucal é composta por células escamosas, com função de revestimento. Dentre as doenças que acometem a cavidade oral, pode-se destacar papiloma, condiloma acuminado, verruga vulgar, hiperplasia epitelial focal, líquen plano, leucoplasia, carcinoma de células escamosas e carcinoma verrucoso (CASTRO *et al.*, 2004).

Grande parte dos casos de câncer de boca tem diagnóstico em estágio avançado, principalmente pelo fato de a lesão inicial da doença se apresentar assintomática nesses pacientes, dificultando o diagnóstico precoce. As lesões iniciais geralmente apresentam manchas brancas ou vermelhas, conhecidas como leucoplasia e eritroplasia, respectivamente. Durante o desenvolvimento do câncer, pode ocorrer a presença de úlcera com dificuldade de cicatrização. Mais tarde, os sintomas incluem sangramento, afrouxamento de dentes, disfagia, disartria, odinofagia, e desenvolvimento de massa tumoral. O tratamento dessas lesões pode ser clínico, com uso de agentes cáusticos que causam destruição do tecido afetado; ou cirúrgico, com excisão cirúrgica, elétrica ou a laser, possibilitando estudo anatomopatológico do tecido (NEVILLE e DAY, 2002; CASTRO *et al.*, 2004).

Zonta e colaboradores (2012) afirmaram que há uma associação entre a infecção pelo HPV e a etiologia do câncer de boca, assim como nos casos de câncer de colo de útero. A infecção da mucosa oral pode ocorrer através do contato oral, urogenital ou autoinfecção, bem como transmissão vertical.

## 2.2 O EXAME CITOLÓGICO NO DIAGNÓSTICO DE CÂNCER E DE MICRORGANISMOS PATOLÓGICOS

### 2.2.1 Citologia Cervicovaginal

Em 1928, George N. Papanicolaou apresentou seu trabalho “Novo Diagnóstico do Câncer”, no qual observou e identificou células cervicais cancerosas em esfregaços vaginais, os quais passaram a ser utilizados como metodologia de escolha na investigação de lesões precursoras de neoplasias cervicais, sendo até hoje uma importante e bem sucedida estratégia no rastreamento populacional e, assim, na prevenção de câncer de colo do útero (NAYLOR, 2000; DERCHAIN, 2005).

A técnica convencional citológica se baseia na retirada por esfoliação de células do tecido a ser analisado e de sua colocação em lâmina de microscopia. Este material é então submetido à fixação, coloração e exame microscópico. Isto permite detectar células anormais e, assim, estimar o risco envolvido nas lesões precursoras do câncer (DERCHAIN, 2005). Para se identificar lesões malignas ou pré-malignas, o esfregaço deve conter células representativas do tecido, preservadas, em número suficiente para o diagnóstico, com uma distribuição uniforme na lâmina, com um número reduzido de artefatos, sem ressecamentos e bem fixadas (BIBO, 1997).

Na coloração de Papanicolaou, utilizam-se corantes com o objetivo de evidenciar a morfologia, graus de maturidade celular e atividade metabólica. Um corante básico, Hematoxilina, tem afinidade pelo núcleo; um corante ácido, Orange G, reage com o citoplasma de células queratinizadas, e um corante policromático (Eosina Amarelada – 36), composto de eosina amarelada, verde brilhante e vesuvina, que oferecem diferentes tonalidades citoplasmáticas (KOSS e MELAMED, 2005). Após a dispersão do material citológico sobre a lâmina para microscopia, a amostra deve ser fixada imediatamente. Em geral, as técnicas de fixação mais utilizadas são imersão em etanol a 95% e aplicação de solução alcoólica de polietilenoglicol a 2%, em gotas ou *spray*. Quando se utiliza solução de polietilenoglicol, este atua impedindo o ressecamento do material ao formar um filme

opaco sobre a lâmina, enquanto o álcool atua como fixador (TAKAHASHI, 1982; KOSS e MELAMED, 2005; CONSOLARO e ENGLER, 2012).

O cérvix é a porção mais baixa do útero, a qual é perfurada pelo canal cervical. Possui uma porção ectocervical constituída por epitélio escamoso, o qual pode apresentar em esfregaços células superficiais, intermediárias, parabasais e basais (Figura 2). Em geral, as células predominantes em um exame citológico cervicovaginal são células do epitélio escamoso, cuja maturação é estrógeno dependente (CIBAS e DUCATMAN, 1996; MEISELS e MORIN, 1997). A porção endocervical ou canal cervical apresenta epitélio glandular, organizado em uma única camada celular secretora de muco. A interface entre os epitélios é denominada junção escamo-colunar (JEC) (ARAUJO, 1999).

As células superficiais escamosas são maduras, achatadas, poligonais e predominantemente eosinofílicas, com diâmetro de 35-45  $\mu\text{m}$ . Possuem núcleo picnótico, isto é, seu material nuclear se torna condensado e retraído (CIBAS e DUCATMAN, 1996; MEISELS e MORIN, 1997; KOSS e MELAMED, 2005). A maior parte das células superficiais aparecem isoladas em esfregaços, muitas vezes apresentando grânulos querato-hialinos intracelulares, que auxiliam na distinção da maturidade de células em rápida proliferação (BIBBO, 1997; KOSS e MELAMED, 2005).

As células intermediárias escamosas possuem formato poligonal, diâmetro de 32-40  $\mu\text{m}$ , núcleo vesicular de 8  $\mu\text{m}$ , com membrana delicada e cromatina finamente granular ou reticular. O citoplasma é cianofílico e pode apresentar dobras citoplasmáticas e conter glicogênio, o qual se cora em amarelo (MEISELS e MORIN, 1997; KOSS e MELAMED, 2005).

Células basais e parabasais são mais imaturas, redondas, cianofílicas e contêm núcleo vesicular, assim como nas intermediárias. Possuem citoplasma geralmente basofílico, que pode ter pequenos vacúolos (KOSS e MELAMED, 2005; CIBAS e DUCATMAN, 1996; MEISELS e MORIN, 1997). Podem se apresentar em maior número nos exames citológicos de mulheres acima de 35 anos ou na presença de processos patológicos, com predomínio em estados de baixa produção de hormônios sexuais femininos (CIBAS e DUCATMAN, 1996; KOSS e MELAMED, 2005). A diferenciação entre células basais e parabasais é difícil, tendo em vista a similaridade entre ambas, residindo na relação núcleo/citoplasma e no tamanho, pois



apresentam núcleo medindo 8  $\mu\text{m}$  de diâmetro, e medem de 10-12 e 12-30  $\mu\text{m}$ , respectivamente. (BIBBO, 1997; KOSS e MELAMED, 2005).

Enquanto as células escamosas são encontradas isoladas ou em pequenos grupos nos esfregaços citológicos, as células glandulares endocervicais são vistas geralmente em tiras ou lençóis. São células alongadas, medindo de 8 a 20  $\mu\text{m}$  no seu maior diâmetro, com citoplasma claro, finamente vacuolizado e palidamente cianofílico, ocasionalmente preenchido com muco. O núcleo excêntrico e vesicular mede cerca de 8  $\mu\text{m}$  e possui cromatina finamente granular e regularmente distribuída, podendo ser observados um ou dois nucléolos pequenos (MEISELS e MORIN, 1997; KOSS e MELAMED, 2005). Estas células endocervicais podem apresentar-se em grupamentos em disposição de “favo de mel” ou em forma de paliçada, dependendo do posicionamento das células na preparação. Ocasionalmente, podem apresentar cílios (KOSS e GOMPEL, 2006).

Células endometriais podem ser observadas em esfregaços cervicovaginais em fases proliferativas do ciclo menstrual, até o 11º dia do ciclo. No entanto, quando visualizadas fora dessa fase ou em mulheres pós-menopausadas, podem indicar doenças do endométrio, inclusive adenocarcinoma. As células endometriais são pequenas, colunares, com diâmetro de 4 a 16  $\mu\text{m}$ . Apresentam-se arranjadas irregularmente, com superposição de núcleos, geralmente em grupamentos como bolas, com padrão de cromatina de difícil distinção, núcleos pequenos e redondos, citoplasma escasso e bordas celulares mal definidas (KOSS e MELAMED, 2005; SOLOMON e NAYAR, 2005).

Histiócitos podem ser observados normalmente no final do ciclo menstrual e no início da fase proliferativa. Podem apresentar diferentes tamanhos, em geral com 12 a 25  $\mu\text{m}$  de diâmetro, possuem citoplasma cianofílico e espumoso e seu núcleo tem formato geralmente riniforme, com cromatina proeminente (BIBBO, 1997; MEISELS e MORIN, 1997).

Leucócitos polimorfonucleares apresentam diâmetro de 12 a 14  $\mu\text{m}$ , são comumente observados em esfregaços no começo e no final do ciclo, sem indicar necessariamente a presença de infecção ou inflamação. Não é comum a presença de linfócitos e plasmócitos em esfregaços normais (MEISELS e MORIN, 1997).

Em citologia cervicovaginal, quando ocorre metaplasia, ou seja, a substituição do epitélio composto por células endocervicais por outro, metaplásico, não próprio daquele local, como resultado de injúria ou irritação crônica causada por processo

inflamatório ou trauma mecânico, na região da JEC, esta passa a ser chamada zona de transformação. A metaplasia é reversível e se dá pela transformação de um tipo de tecido adulto em outro, em geral adulto (TAMAYO, 1987; COTRAN *et al.*, 1994; KOSS e MELAMED, 2005). A metaplasia pode representar um mecanismo protetor envolvendo substituição adaptativa de células mais sensíveis a estresse por outras mais resistentes (KUMAR *et al.*, 2005). A substituição epitelial pode ser parcial ou total e o epitélio escamoso resultante pode ser maduro ou imaturo. As células metaplásicas apresentam tamanho variável, núcleos semelhantes aos das células endocervicais, forma que vai de redonda a poligonal, dependendo do seu grau de diferenciação, podendo apresentar finas projeções (KOSS e MELAMED, 2005). Em geral, é neste tecido que iniciam as lesões causadas pelo HPV, podendo evoluir para as displasias e neoplasias. (BORSATTO *et al.*, 2011).

O prognóstico no câncer de colo de útero em muito depende da sua extensão no momento do exame, estando sua mortalidade fortemente associada ao diagnóstico tardio e em fases avançadas (CAETANO *et al.*, 2006). As taxas de câncer de colo do útero se reduziram sensivelmente na maior parte dos países desenvolvidos, como resultado de detecção e tratamento em programas desenvolvidos desde a introdução do exame de Papanicolaou na atenção básica, a partir dos anos 1950 (ZHAO *et al.*, 2011).

A qualidade da amostra tem grande influência na confiabilidade do exame citológico. A presença de células endocervicais e ou metaplásicas é um indicativo de representatividade da JEC, o que indica coleta correta de material (ARAUJO, 1999).

Uma vez satisfatória, a amostra pode ser categorizada como: dentro dos limites da normalidade, com alterações celulares benignas e ou com anormalidades celulares. As alterações celulares benignas podem ser visualizadas em amostras de pacientes que apresentem inflamação, reparação, metaplasia escamosa imatura, atrofia com inflamação, ou que tenham sido submetidas à radiação, entre outros casos. As anormalidades celulares podem ser classificadas como: atipias celulares de significado indeterminado, lesão intraepitelial de baixo grau, células escamosas atípicas não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau, lesão intraepitelial de alto grau, lesão intraepitelial de alto grau não podendo excluir microinvasão, carcinoma epidermoide invasor, adenocarcinoma *in situ*, adenocarcinoma invasor e outras neoplasias. Os carcinomas são classificados como epidermóides ou

escamocelulares quando ocorrem nas células escamosas, e adenocarcinomas, quando nas células glandulares (DERCHAIN *et al.*, 2005; SHEIDT *et al.*, 2010).

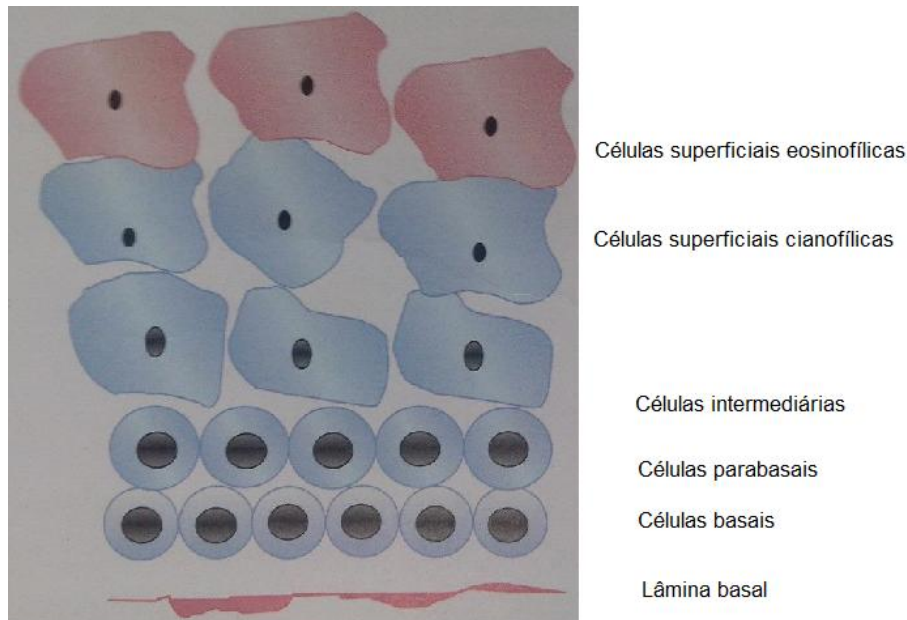


FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS GRAUS DE MATURAÇÃO DO EPITÉLIO ESTRATIFICADO ESCAMOSO VAGINAL E CERVICAL

FONTE: adaptado de CONSOLARO e ENGLER, 2012

### 2.2.2 Citologia Oral

Quando se analisa uma lesão suspeita em mucosa oral, pode-se utilizar a citologia esfoliativa como adjuvante, por se tratar de um método não invasivo útil no rastreamento de lesões, principalmente nos casos de neoplasias malignas de natureza epitelial (EDRIS *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2011).

A cavidade oral é revestida por uma mucosa constituída por epitélio escamoso estratificado e lâmina própria constituída por tecido conjuntivo denso, semelhante à mucosa escamosa cervicovaginal. O objetivo do exame citológico de mucosa oral é detectar células epiteliais alteradas, obtidas a partir de uma área lesada (FERRARO *et al.*, 2011).

### 2.2.3 Alterações de Mucosa Vaginal e Mucosa Oral Associadas a Microrganismos

As doenças sexualmente transmissíveis (DST) são um problema de saúde pública no Brasil. Estão entre as cinco principais causas de procura por serviço de saúde no país. Quando não tratadas, podem causar problemas de fertilidade e de gestação. Muitas vezes, não apresentam sintomas significantes, o que pode dificultar sua detecção (CARRET *et al.*, 2004).

O HPV é um vírus da família *Papillomaviridae*. Existem relatos na literatura de alguns tipos do vírus capazes de provocar lesões malignas oncogênicas em seres humanos em trato genital, pele, ânus, esôfago, dentre outros tecidos (CAVALCANTI e CARESTIATO, 2006; MONSONEGO *et al.*, 2001; KOSS e MELAMED, 2005; MOORE *et al.*, 2012). Com a infecção da célula, o vírus pode ser eliminado pelo sistema imunológico do hospedeiro, ficar latente, produzir infecção clínica ou subclínica ativa, ou integrar seu genoma ao da célula hospedeira imatura e impedir ou alterar sua diferenciação (BAGARELLI e OLIANI, 2004).

São DST bastante frequentes: gonorreia, sífilis, infecção por clamídia, tricomoniase, herpes genital, hepatite B, cancro mole, condiloma e a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), provocada pela infecção pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Tais doenças são geralmente transmitidas durante relações sexuais desprotegidas, por transfusão de sangue contaminado, por compartilhamento de seringas e agulhas contaminadas, ou da mãe para o bebê durante a gestação ou parto (RODRIGUES *et al.*, 2011).

O corrimento genital é um dos problemas mais comuns que levam mulheres a procurarem atendimento médico. A ocorrência de corrimento está diretamente relacionada com vaginose bacteriana, tricomoniase ou candidíase vaginal, em cerca de 90% dos casos. A vaginose bacteriana se dá pela alteração na microbiota normal vaginal, associada à redução ou ausência de bacilos de Döderlein. Estes bacilos constituem um grupo heterogêneo de bactérias características das secreções vaginais e têm a função de hidrolisar o glicogênio presente em células pavimentosas descamadas, produzindo ácido lático nesse processo e, assim, baixando o pH vaginal e inibindo o crescimento de outros microrganismos (OLIVEIRA *et al.*, 2008; LEVI *et al.*, 2011).

A presença dos microrganismos *Gardnerella vaginallis* / *Mobiluncus spp* são comuns nos esfregaços cervicovaginais que apresentem processos de vaginose

bacteriana. Sugere-se a presença desses microrganismos mediante visualização de *clue cells* ou *comma cells*, devido ao acúmulo de cocobacilos (*clue cell*) ou bacilos finos e curvos (*comma cell*), aderidos na superfície celular (SOLOMON e NAYAR, 2005; KOSS e MELAMED, 2005).

*Trichomonas vaginallis* é o protozoário causador da tricomoníase. A infecção pode ser assintomática, causar prurido intenso e descarga vaginal. Se não tratada, pode causar problemas relacionadas à gravidez e à fertilidade. O exame citológico de amostra cervical pode revelar alterações morfológicas e processo inflamatório induzido pelo microrganismo. Em alguns casos, é possível observar o microrganismo flagelado, com núcleo pálido e deslocado (MACIEL *et al.*, 2004; KOSS e MELAMED, 2005).

A candidíase vaginal é causada por fungo do gênero *Candida*, na maioria das vezes da espécie *albicans* que, em determinadas condições, tem sua multiplicação favorecida, tornando-se patogênico. Seu diagnóstico é dado partindo das manifestações clínicas, já que é um fungo oportunista e pode estar presente na microbiota vaginal sem causar infecção (CAVALCANTE *et al.*, 2005). Na citologia cervicovaginal, pseudo-hifas segmentadas com formas alongadas e ou presença de células leveduriformes sugerem a presença de *Candida spp* (SOLOMON e NAYAR, 2005; KOSS e MELAMED, 2005).

## 2.3 RASTREAMENTO DO CÂNCER DE COLO DE ÚTERO

No Brasil, o câncer de colo do útero é historicamente uma preocupação de saúde pública. Em 1984, foi lançado o Programa de Assistência Integral à Saúde da Mulher, que tinha como objetivo a prevenção do câncer de colo do útero e de mama. Em 1998, foi instituído o Programa Nacional de Combate ao Câncer de Colo do Útero através da Portaria GM/MS nº 3040/98. O Sistema de Informação do Câncer do Colo do Útero (SISCOLO) foi instituído pela Portaria nº 408/99. Trata-se de um sistema de informações para o monitoramento das ações e dos processos de mobilização e captação de mulheres. Em 2005, o Plano de Ação para o Controle dos Cânceres de Colo e de Mama propôs o aumento de cobertura dos exames de rastreamento, garantia da qualidade, fortalecimento do sistema de informação, desenvolvimento de capacitações, estratégia de mobilização social e

desenvolvimento de pesquisas. O Pacto pela Saúde em 2006 propôs inclusão de indicadores e metas para estados e municípios. Em 2011, com o lançamento do Plano Nacional de Fortalecimento da Rede de Prevenção, Diagnóstico e Tratamento do Câncer, houve um planejamento na promoção de investimento técnico e financeiro para o aumento das ações de controle do câncer de colo do útero (BRASIL/ MS, 2014).

As Diretrizes Brasileiras para o rastreamento de câncer de colo do útero recomendam que o método de rastreamento desse tipo de câncer e de suas lesões precursoras seja o exame citopatológico. O intervalo entre os exames deve ser de três anos, após dois exames negativos consecutivos com intervalo anual. O início da coleta deve ser aos 25 anos de idade para as mulheres que já tiveram atividade sexual, seguindo até 64 anos, quando, após essa idade, tiverem ao menos dois exames negativos consecutivos nos últimos cinco anos. Mulheres com história de lesões pré-neoplásicas do colo do útero devem ser acompanhadas com maior frequência (BRASIL/ MS, 2014).

Testes para detecção do vírus HPV podem auxiliar na detecção precoce do câncer de colo de útero e suas lesões precursoras. Um teste de captura híbrida identifica três tipos de vírus de alto risco oncogênico e cinco tipos de vírus de baixo risco oncogênico (CAETANO *et al.*, 2006).

### 2.3.1 Sistema Bethesda de Classificação para Citopatologia Cervicovaginal

Desde a classificação de Papanicolaou, vários sistemas de classificação em citologia cervicovaginal foram desenvolvidos. O sistema mais difundido atualmente é o Sistema Bethesda (NCI BETHESDA SYSTEM, 2013; FERNANDES *et al.*, 2012).

O primeiro encontro de citologistas com o objetivo de desenvolver um sistema de descrição e interpretação de esfregaços de Papanicolaou foi em 1988, em Bethesda, EUA. Tal encontro resultou no Sistema Bethesda, atualizado em 1991 e em 2001, e utilizado atualmente para classificação de resultados de exames citológicos cervicovaginais (SOLOMON e NAYAR, 2005).

Pela classificação de Bethesda, uma amostra insatisfatória indica que esta não é confiável para detecção de anormalidades epiteliais cervicais. Em geral, a insatisfatoriedade se dá pela presença de sangue ou leucócitos em excesso, áreas

densas, fixação deficiente, artefatos de fixação e contaminação, prejudicando a interpretação de aproximadamente 75% ou mais das células epiteliais. Também ocorre insatisfatoriedade quando não se observam componentes endocervicais ou da zona de transformação na lâmina. A amostra é considerada satisfatória, mesmo nessas condições, se apresentar células características de lesão (SOLOMON e NAYAR, 2005).

Por esse sistema de classificação, alterações morfológicas indicativas de anormalidades epiteliais cervicais podem ser classificadas em:

Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US) - referem-se a alterações citológicas sugestivas de lesão intraepitelial escamosa, qualitativa ou quantitativamente insuficientes para um resultado preciso de lesão. As células geralmente possuem núcleo de 2,5 a 3 vezes maior que uma célula escamosa intermediária normal, relação núcleo/citoplasma ligeiramente aumentada, hipercromasia mínima do núcleo, paraceratose atípica, irregularidades de forma nuclear e na distribuição da cromatina (SOLOMON e NAYAR, 2005);

Células escamosas atípicas, não é possível excluir lesão intraepitelial de alto grau (ASC-H) - classificação que individualiza atípias citológicas de células escamosas sugestivas de lesão intraepitelial de alto grau, com ausência de critérios suficientes para um resultado definitivo. São casos associados a maior risco de lesões intraepiteliais do que esfregaços classificados como ASC-US. A relação núcleo/citoplasma pode ser comparada aos casos de lesão de alto grau. Podem apresentar hipercromasia nuclear e irregularidades de forma nuclear e distribuição da cromatina (IARC, 2014; SOLOMON e NAYAR, 2005);

Lesão escamosa intraepitelial de baixo grau (LSIL) – Classificação que engloba alterações celulares associadas a efeitos citopáticos do HPV, os quais são atipia colocítica e displasia leve. As células ocorrem isoladas ou em lençóis e predominam as células escamosas do tipo intermediária ou superficial discarióticas, apresentando núcleos arredondados ou ovais, aumentados em cerca de três vezes o tamanho de uma célula intermediária normal. A membrana nuclear apresenta-se geralmente lisa e discernível e a cromatina finamente granular ou reticular (CIBAS e DUCATMAN, 1996; MEISELS e MORIN, 1997; SOLOMON e NAYAR, 2005). Lesão escamosa intraepitelial de alto grau (HSIL) - compreende displasia moderada, displasia severa e carcinoma *in situ*. Podem apresentar maturação epitelial alterada, com camadas desorganizadas e atípias nucleares em todas as camadas,

principalmente nas profundas. Algumas das lesões podem possuir células com citoplasma abundante e anormalmente queratinizado, com núcleos grandes e hipercromáticos, cromatina borrada, pleomorfismo, anisocariose e hipercromasia. Ocorre aumento na relação núcleo/citoplasma, a cromatina é granular ou mostra bandas irregulares. Os nucléolos são pequenos ou não estão visíveis. A membrana nuclear é muitas vezes irregularmente corada (MEISELS e MORIN, 1997; BIBBO, 1997);

Carcinomas invasores - apresentam diátese tumoral, pleomorfismo celular acentuado, podendo ser visualizados nucléolos e núcleos aberrantes (SOLOMON e NAYAR, 2005; KOSS e MELAMED, 2005);

Células glandulares atípicas (AGC) - são atípias glandulares com alterações nucleares que excedem os processos reacionais ou reparativos, mas que não chegam a adenocarcinoma. Refere-se a células endocervicais ou endometriais que mostram atípias nucleares mais evidentes em relação às de alterações reativas ou reparativas (CIBAS e DUCATMAN, 1996). Podem se apresentar como células endocervicais atípicas sem outras especificações (AGC-SOE), apresentando células em camadas, blocos e rosetas, com sobreposição nuclear, geralmente com bordas discerníveis, moderada hipercromasia, com variação no tamanho e forma nucleares, ou como células endocervicais atípicas possivelmente neoplásicas (AGC-NEO, apresentando grupamentos com sobreposição nuclear em camadas, blocos e rosetas, raramente apresentando plumagem, com bordas celulares mal definidas, mitoses ocasionais e proporções núcleo/citoplasma aumentadas (NCI BETHESDA SYSTEM, 2013; SOLOMON e NAYAR, 2005);

Adenocarcinomas: Apresentam lençóis de células glandulares endocervicais malignas compactadas, bem como grupos circulares denominados de rosetas, com sobreposição nuclear e perda de polaridade. Os núcleos geralmente são grandes e hipercromáticos, com presença de macronúcleolos. A cromatina tem padrão grosseiramente granular e distribuição regular (SOLOMON e NAYAR, 2005).



### 2.3.2 Nomenclatura Brasileira para Laudos Citopatológicos Cervicais

A Nomenclatura Brasileira para Laudos Citopatológicos Cervicais foi elaborada no ano de 2002 e tem sofrido constantes modificações desde então. Assim como o Sistema Bethesda, classifica a amostra citológica segundo a satisfatoriedade, considerando insatisfatórias amostras cuja leitura esteja prejudicada por material acelular ou hipocelular, leitura prejudicada em mais de 75% do esfregaço pela presença de sangue, contaminantes, dessecação, superposição celular intensa, entre outros. O resultado se dá entre as classificações: “Dentro dos limites da normalidade, no material examinado”; “Alterações celulares benignas”; “Atipias celulares” (BRASIL/ MS, 2012).

As alterações celulares benignas incluem processos de inflamação, reparo, metaplasia escamosa imatura, atrofia com inflamação, radiação, entre outras alterações. As atipias celulares podem ser classificadas em:

Células atípicas de significado indeterminado					
Escamosas		Glandulares		De origem indefinida	
Possivelmente e não neoplásicas	Não se pode afastar lesão intraepitelial de alto grau	Possivelmente não neoplásicas	Não se pode afastar lesão intraepitelial de alto grau	Possivelmente não neoplásicas	Não se pode afastar lesão intraepitelial de alto grau
Lesões em células escamosas					
Lesão intraepitelial de baixo grau (efeito citopático pelo HPV e Neoplasia intraepitelial cervical grau I)		Lesão intraepitelial de alto grau ( Neoplasias intraepiteliais cervicais graus II e III)		Lesão intraepitelial de alto grau, não podendo excluir microinvasão	Carcinoma epidermoide invasor
Lesões em células glandulares					
Adenocarcinoma cervical <i>in situ</i>	Adenocarcinoma invasor			Outras neoplasias malignas	Presença de células endometriais (na pós-menopausa ou acima de 40 anos, fora do período menstrual)
-	Cervical	Endometrial	Sem outras especificações	-	-

QUADRO 1 - NOMENCLATURA BRASILEIRA PARA LAUDOS CITOPATOLOGICOS CERVICAIS  
FONTE: adaptado de BRASIL/MS (2012).

### 2.3.3 Adesão ao Exame de Papanicolaou

Vale e colaboradores (2010) afirmaram que, no Brasil, apesar de existir uma estratégia de rastreamento do câncer de colo do útero, as taxas de mortalidade devido a essa patologia não tem decrescido. Segundo os autores, o que predomina no país é o denominado rastreamento oportunístico, com realização de controles não relacionados com normas estabelecidas, mas a partir da procura ocasional dos serviços de saúde determinada por razões diversas que não o rastreamento do câncer do colo do útero.

É importante ressaltar que a história da mulher na sociedade pode auxiliar no entendimento de questões atuais que envolvem inseguranças verificadas em mulheres quando estas são submetidas a certas práticas em seu corpo (CRUZ e LOUREIRO, 2008).

Ferreira (2009) estudou motivos para a não realização do exame citopatológico cervicovaginal em um grupo de mulheres e observou a existência de desconhecimento sobre o exame e sobre o câncer de colo uterino. Vergonha e constrangimento foram sentimentos expressados pelas participantes da pesquisa, além dos relatos de dificuldade de acesso ao serviço de saúde. Fernandes e colaboradores (2009) alegaram que o desconhecimento sobre o procedimento de coleta é frequente mesmo entre mulheres que fazem o exame citopatológico regularmente, o que revela uma deficiência de informação do serviço de saúde para com as pacientes.

Tendo isso em vista, pode-se destacar a importância da informação sobre o câncer de colo do útero e os benefícios da prevenção por meio do exame citológico do colo uterino. É interessante que as mulheres entendam a técnica de coleta para que se promova a desmistificação desse tipo de exame e que elas possam se sentir seguras ao realizá-lo, na tentativa de aumentar a procura dos serviços de saúde para rastreamento do câncer de colo do útero.

## 2.4 CITOLOGIA EM MEIO LÍQUIDO

Muitas vezes amostras citológicas necessitam de transporte até o laboratório para serem processadas e analisadas. Amostras obtidas por esfoliação, se

depositadas diretamente em lâmina de microscopia, podem ser imediatamente fixadas e coradas, como no exame convencional de citologia cervicovaginal ou mesmo da citologia de escarro. No caso de obtenção de outros materiais, como na citologia de lavados, líquido cefalorraquidiano (LCR), urina, entre outros, há necessidade de sedimentação ou centrifugação, para que se possa fixar as células na lâmina. No entanto, há várias limitações em ambos os casos. Células esfoliadas em esfregaços, podem se apresentar arrebatadas, superpostas ou obscurecidas por artefatos, leucócitos, hemácias ou microrganismos (AMARAL *et al.*, 2008). Células de líquidos biológicos podem também aparecer degeneradas, especialmente se o meio biológico em que se encontram é impróprio para a sua conservação, como nos casos de urina ou LCR. Dimas e Puccioni-Sohler (2008) destacaram a importância da análise de LCR em até 48 horas após a coleta para segurança e confiabilidade do resultado citológico, devido à degeneração geralmente ocasionada nas células após esse prazo.

A metodologia de Papanicolaou tem sido questionada em alguns estudos, nos quais se apontam para índices não ideais de sensibilidade dos preparados convencionais de material citológico, devido à representatividade inadequada das células escamosas, endocervicais e da junção escamo-colunar (JEC), secagem e ou má fixação do material, falta de homogeneidade na distribuição celular do esfregaço, além do obscurecimento por leucócitos, hemácias e restos celulares (LONGATTO FILHO *et al.*, 2005; MACHADO *et al.*, 2008).

Na citologia em meio líquido, as amostras colhidas com escova citológica são depositadas em um líquido conservante e podem ser transportadas até o laboratório para o processamento, no qual o líquido é homogeneizado na intenção de destacar células aderidas à escova e obter-se celularidade amostral aleatorizada, além de permitir a realização de outros testes com o material obtido (HUTCHINSON *et al.*, 1999; LONGATTO FILHO *et al.*, 2005).

Alguns trabalhos indicam melhora no rastreamento pacientes de alto risco quando se utiliza testes moleculares a partir de conservação celular em meio líquido em conjunto com a citologia convencional (KARNON *et al.*, 2004; FREMONT-SMITH *et al.*, 2004; DOYLE *et al.*, 2006; RONCO *et al.*, 2006; BEERMAN *et al.*, 2009; MÉNDEZ e IZQUIERDO, 2011; WHITLOCK *et al.*, 2011).

Os meios líquidos empregados na coleta de amostras citológicas contêm fixadores, os quais são capazes de preservar a morfologia celular e a composição

química das células após a retirada do organismo (CAPUTO *et al.*, 2009). Essas substâncias devem penetrar rapidamente nas células, minimizar a retração e a distorção da célula, substituir a água celular, inativar enzimas autolíticas, tornar a membrana celular permeável aos corantes e facilitar a adesão celular a lâmina (KOSS e MELAMED, 2005).

A fixação pode ser realizada por agentes físicos químicos, que reagem quimicamente com macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos e lipídeos, promovendo a sua estabilização molecular, coagulando-as ou tornando-as insolúveis e, conseqüentemente, precipitando-as nos tecidos de origem (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1991).

Álcool etílico, isopropílico e metílico, são utilizados como agentes desnaturantes de proteínas, os quais alteram a constante isoelétrica das proteínas, causando a sua precipitação, e rompendo desta forma as suas ligações hidrofílicas, importantes na manutenção da sua estrutura terciária (BENCROFT e STEVENS, 1990; KOSS e MELAMED, 2005). Fixadores a base de aldeídos são amplamente utilizados na anatomia patológica e histologia (CAPUTO *et al.*, 2009). Grupamentos aldeídos possuem reatividade, estabelecendo ligações *cross-linking* com as proteínas e carboidratos das células e agindo como agente desnaturantes (COSTA JUNIOR e MANSUR, 2008).

Atualmente, existem vários meios líquidos para exames citológicos disponíveis comercialmente, tais como: DNA-Citoliq®(Digene-Brasil), Thin Prep®(Cytyc Corp), SurePath® (Beckton-Dickinson), LiquiPrep® (Sirius). Apesar da existência de estudos apontando uma superioridade da citologia em meio líquido em comparação ao método convencional de Papanicolaou em termos de qualidade amostral, o que detém a implantação do método em meio líquido no sistema de saúde brasileiro é o seu custo, tornando inviável o seu uso como metodologia de escolha em unidades de saúde e em programas de prevenção do câncer do colo do útero (MACHADO *et al.*, 2008). Desta forma, torna-se interessante buscar metodologias alternativas para coleta, transporte e conservação de células, com o objetivo de diminuir custos e expandir o uso de meios líquidos em exames citológicos, sendo necessários estudos para a implantação de métodos acessíveis a sistemas de saúde pública, para que a cobertura seja ampliada no rastreamento de vários tipos de câncer.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a adequabilidade de meios líquidos alternativos para a coleta e preservação de amostras para exames citológicos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar o emprego de diferentes composições de meios líquidos para mucosa oral e cervicovaginal;
- Avaliar o desempenho das composições desenvolvidas na conservação celular e eleger um ou mais meios líquidos promissores;
- Comparar resultados obtidos na leitura das lâminas provenientes dos meios líquidos desenvolvidos promissores, meio líquido comercial e metodologia convencional de Papanicolaou.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Reagentes, Material de Consumo e Equipamentos Utilizados

Escovas cônicas, espéculos vaginais, tubos plásticos cônicos de 15 ml com tampa hermética tipo Falcon, lâminas para microscopia de 25 x 75 mm, lamínulas de 24 x 60 mm, capela de exaustão de ar Casplast<sup>®</sup>, misturador tipo vortex Phoenix<sup>®</sup>, balança analítica, centrífuga Celm<sup>®</sup> LS-3, citocentrífuga Cytopro Wescor<sup>®</sup>, medidor de pH Mettler Toledo MP<sup>®</sup> 220, geladeira, microscópio de luz binocular Nikon Eclipse<sup>®</sup> E 200 com objetivas de 10x, 40x e 100x e oculares de 10x, microscópio com sistema para fotomicrografia digital (NIKON Eclipse E200 com câmera digital SANSUNG<sup>®</sup> FCC131 e sistema de captura de imagem Dino Capture 2.0), etanol, ácido acético, formaldeído, metanol, meio líquido comercial SurePath (Becton Dickinson), kit para coloração de Papanicolaou (NEWPROV), Entelan<sup>®</sup>.

#### 4.1.2 Material citológico

Foram realizadas coletas de amostras de material citológico oral e cervicovaginal, os quais foram divididos em grupos:

##### A) Testes preliminares

Coletou-se amostras de 10 indivíduos voluntários, selecionados entre alunos do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Coletou-se ainda 19 amostras de material citológico cervicovaginal de doadoras selecionadas entre integrantes do Clube de Mães União Vila das Torres, Curitiba-PR e alunas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná.

B) Estudo de Amostras Citológicas Preservadas em Meios Líquidos IFP e EtIFP em Comparação a Amostras de Citologia Convencional e de Citologia em Meio Líquido Comercial SurePath (BD)

Coletou-se amostras citológicas cervicovaginais de 40 voluntárias selecionadas entre alunas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR.

Os voluntários assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Anexo 1) após esclarecimentos sobre o trabalho, como aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR (Protocolo nº 10747412.1.0000.0102).

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Recrutamento de Voluntários e Coleta de Material

Recrutou-se voluntários, responsabilizando-se por quaisquer dúvidas dos sujeitos da pesquisa, anteriores ou posteriores, e observando a liberdade dos mesmos em aceitarem participar.

Realizou-se o recrutamento por convite direto dos 10 voluntários entre os alunos do Curso de Farmácia da UFPR, considerados sadios por não apresentarem qualquer sinal ou sintoma de doença, com idades entre 20 e 30 anos, de ambos os sexos, não tabagistas, não etilistas e sem aparelho ortodôntico para os testes preliminares com material de citologia oral. Posteriormente, os indivíduos foram orientados para realização das coletas no Laboratório de Citologia Clínica do Curso de Farmácia da UFPR.

Realizou-se o recrutamento de 59 mulheres com idades de 19 a 64 anos, consideradas saudáveis por não apresentarem qualquer sinal ou sintoma de doença, selecionadas entre integrantes do Clube de Mãe União Vila Torres e alunas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. No caso do grupo da Vila Torres, promoveu-se visitas ao Clube de Mães, estabelecendo-se uma parceria. Nas visitas, realizou-se um importante trabalho de conscientização, sendo expostas informações sobre o câncer de colo do útero e a sua prevenção por meio do exame de Papanicolaou. Nesses encontros, a pesquisa foi descrita às presentes, que foram convidadas a participar voluntariamente do trabalho. As participantes foram encaminhadas ao Clube de Mães União Vila Torres, onde profissionais habilitados

coletaram o material, em uma sala equipada adequadamente. As alunas de pós-graduação da UFPR foram recrutadas por convite direto, nas dependências da Universidade. Conscientizou-se as voluntárias em relação à importância do trabalho, da coleta de material e do exame, convidando-as a participar da pesquisa. Realizou-se as coletas em uma sala equipada do Laboratório Escola do Curso de Farmácia da UFPR.

#### 4.2.2 Testes Preliminares

Os testes preliminares foram realizados de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 3.

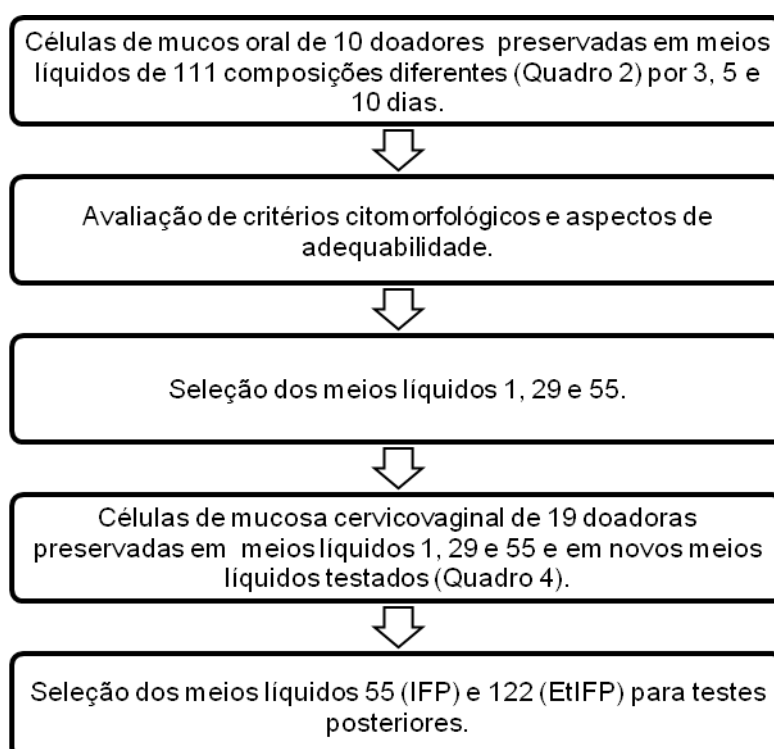


FIGURA 3: FLUXOGRAMA DOS TESTES PRELIMINARES EM CÉLULAS DE MUCOSA ORAL E CERVICOVAGINAL  
FONTE: A autora.



#### 4.2.2.1 Testes preliminares com material citológico de boca

Coletou-se material citológico de mucosa oral de 10 indivíduos, a fim de se obter material para a realização de testes preliminares para o desenvolvimento de um ou mais meios líquidos adequado(s) para a coleta, fixação e preservação de amostras citológicas.

Testou-se 111 diferentes composições de meios líquidos, com variações em relação à presença e concentração de etanol, metanol, ácido acético, isopropanol, formaldeído e glutaraldeído, bem como variações em relação ao controle de pH e nas associações entre os vários componentes (Quadro 2). Cada composição de meios líquidos foi testada com tempos de conservação celular de 3, 5 e 10 dias, à temperatura ambiente.

Meio Líquido	Et (ml/dl)	Form (ml/dl)	Met (ml/dl)	Ác.ac (ml/dl)	Glut (ml/dl)	Isop (ml/dl)	T P	H <sub>2</sub> O P
1	99,5	-	-	-	-	-		
2	95	-	-	-	-	-	X	
3	70	-	-	-	-	-	X	
4	30	-	-	-	-	-	X	
5	95	-	-	-	-	-		X
6	70	-	-	-	-	-		X
7	30	-	-	-	-	-		X
8	-	1	-	-	-	-	X	
9	-	0,5	-	-	-	-	X	
10	-	-	-	-	1	-	X	
11	-	-	-	-	0,5	-	X	
12	-	-	1	-	-	-	X	
13	-	-	1	-	-	-		X
14	-	-	1	0,3	-	-	X	
15	-	-	1	0,3	-	-		X
16	-	-	-	-	-	1	X	
17	-	-	-	-	-	1		X
18	-	-	-	-	-	3	X	
19	-	-	-	-	-	3		X
20	-	-	-	-	-	50	X	
21	-	-	-	-	-	80	X	
22	-	-	-	-	-	50		X
23	-	-	-	-	-	80		X
24	95	1	-	-	-	-	X	
25	70	1	-	-	-	-	X	
26	30	1	-	-	-	-	X	
27	95	1	-	-	-	-		X
28	70	1	-	-	-	-		X
29	-	1	1	-	-	-	X	
30	-	1	1	-	-	-		X
31	-	1	1	-	-	-	X	
32	-	1	1	0,3	-	-		X
33	95	-	1	-	-	-	X	
34	70	-	1	-	-	-	X	
35	30	-	1	-	-	-	X	
36	95	-	1	-	-	-		X
37	70	-	1	-	-	-		X
38	95	-	1	0,3	-	-	X	
39	70	-	1	0,3	-	-	X	
40	30	-	1	0,3	-	-	X	
41	95	-	1	0,3	-	-		X
42	70	-	1	0,3	-	-		X
43	95	-	-	-	-	1	X	
44	70	-	-	-	-	1	X	
45	30	-	-	-	-	1	X	

QUADRO 2 – COMPOSIÇÕES DE MEIOS LÍQUIDOS A SEREM TESTADOS PRELIMINARMENTE PARA ESTUDOS CITOLÓGICOS EM MATERIAL DE MUCOSA ORAL

NOTA: \* Concentrações dos soluções reagentes utilizadas. Et-etanol 99,5 % (ml/dl); Form-formaldeído 37% (ml/dl); Met-metanol 99,9% (ml/dl); Ác.Ac - ácido acético 99,9% (ml/dl); Glu – glutaraldeído 25% (ml/dl); Isop-isopropanol 99,9% (ml/dl); TP-tampão fosfato 10 mmoles/l pH 7,4; H<sub>2</sub>O P- água purificada tipo 1.

(Continuação na próxima página)

Meio Líquido	Et (ml/dl)	Form (ml/dl)	Met (ml/dl)	Ác.ac (ml/dl)	Glut (ml/dl)	Isop (ml/dl)	T P	H <sub>2</sub> O P
46	95	-	-	-	-	3	X	
47	70	-	-	-	-	3	X	
48	30	-	-	-	-	3	X	
49	95	-	-	-	-	1		X
50	70	-	-	-	-	1		X
51	95	-	-	-	-	3		X
52	70	-	-	-	-	3		X
53	30	-	-	-	-	50		X
54	30	-	-	-	-	50	X	
55	-	1	-	-	-	1	X	
56	-	1	-	-	-	3	X	
57	-	1	-	-	-	50	X	
58	-	1	-	-	-	80	X	
59	-	1	-	-	-	50		X
60	-	1	-	-	-	80		X
61	-	-	1	-	-	1	X	
62	-	-	1	-	-	3	X	
63	-	-	1	-	-	50	X	
64	-	-	1	-	-	80	X	
65	-	-	1	-	-	50		X
66	-	-	1	-	-	80		X
67	95	1	1	-	-	-	X	
68	70	1	1	-	-	-	X	
69	30	1	1	-	-	-	X	
70	95	1	1	-	-	-		X
71	70	1	1	-	-	-		X
72	95	1	-	-	-	1	X	
73	70	1	-	-	-	1	X	
74	30	1	-	-	-	1	X	
75	95	1	-	-	-	3	X	
76	70	1	-	-	-	3	X	
77	30	1	-	-	-	3	X	
78	30	1	-	-	-	50	X	
79	95	1	-	-	-	1		X
80	70	1	-	-	-	1		X
81	95	1	-	-	-	3		X
82	70	1	-	-	-	3		X
83	30	1	-	-	-	50		X
84	95	-	1	-	-	1	X	
85	70	-	1	-	-	1	X	
86	30	-	1	-	-	1	X	
87	95	-	1	-	-	3	X	
88	70	-	1	-	-	3	X	
89	30	-	1	-	-	3	X	
90	30	-	1	-	-	50	X	
91	95	-	1	-	-	1		X

QUADRO 2 – COMPOSIÇÕES DE MEIOS LÍQUIDOS A SEREM TESTADOS PRELIMINARMENTE PARA ESTUDOS CITOLÓGICOS EM MATERIAL DE MUCOSA ORAL

NOTA: \* Concentrações dos soluções reagentes utilizadas. Et-etanol 99,5 % (ml/dl); Form-formaldeído 37% (ml/dl); Met-metanol 99,9% (ml/dl); Ác.Ac - ácido acético 99,9% (ml/dl); Glu – glutaraldeído 25% (ml/dl); isop-isopropanol 99,9% (ml/dl); TP-tampão fosfato 10 mmoles/l pH 7,4; H<sub>2</sub>O P- água purificada tipo 1.

(Continuação na próxima página)

Meio Líquido	Et (ml/dl)	Form (ml/dl)	Met (ml/dl)	Ác.ac (ml/dl)	Glut (ml/dl)	Isop (ml/dl)	T P	H <sub>2</sub> O P
92	70	-	1	-	-	1		X
93	70	-	1	-	-	3		X
94	30	-	1	-	-	50		X
95	-	1	1	-	-	1	X	
96	-	1	1	-	-	3	X	
97	-	1	1	-	-	50	X	
98	-	1	1	-	-	80	X	
99	-	1	1	-	-	80		X
100	95	1	1	-	-	1	X	
101	70	1	1	-	-	1	X	
102	30	1	1	-	-	1	X	
103	95	1	1	-	-	3	X	
104	70	1	1	-	-	3	X	
105	30	1	1	-	-	3	X	
106	30	1	1	-	-	50	X	
107	20	1	1	-	-	70	X	
108	70	1	1	-	-	1		X
109	70	1	1	-	-	3		X
110	30	1	1	-	-	50		X
111	20	1	1	-	-	70		X

QUADRO 2 – COMPOSIÇÕES DE MEIOS LÍQUIDOS A SEREM TESTADOS PRELIMINARMENTE PARA ESTUDOS CITOLÓGICOS EM MATERIAL DE MUCOSA ORAL

NOTA: \* Concentrações dos soluções reagentes utilizadas. Et-etanol 99,5 % (ml/dl); Form-formaldeído 37% (ml/dl); met-metanol 99,9% (ml/dl); Ác Ac - ácido acético 99,9% (ml/dl); Glu – glutaraldeído 25% (ml/dl); Isop-isopropanol 99,9% (ml/dl); TP-tampão fosfato 10 mmoles/l pH 7,4; H<sub>2</sub>O P- água purificada tipo 1.

#### 4.2.2.1.1 Coleta de material citológico de boca

Realizou-se a coleta de material por raspagem da mucosa jugal, com escova citológica cônica, de modo a friccionar a mucosa, transferindo-se o material para um tubo plástico cônico tipo Falcon com tampa hermética de rosca, com capacidade para 15 ml, contendo 2 ml de meio líquido em teste.

#### 4.2.2.1.2 Processamento de material

Processou-se todas as amostras de citologia em meio líquido de acordo com Machado e colaboradores (2008), com modificações: homogeneizou-se o material em agitador tipo vórtex por 20 segundos, retirando-se a escova cônica e centrifugando-se a 289xg durante 5 minutos, desprezando-se o sobrenadante por

inversão. Em seguida, prosseguiu-se com a ressuspensão do sedimento nos meios líquidos em análise, por homogenização em vórtex, retirando-se o sobrenadante com pipeta automática. Confeccionou-se os esfregaços por espalhamento de 50 µl dos sedimentos em forma circular, com o auxílio de ponteira descartável de pipeta automática, secando-os ao ar. Fixou-se o material com etanol absoluto comercial durante 20 min, precedendo-se à coloração de Papanicolaou, com emprego de corantes Newprov® (Quadro 3) e montagem com Entelan®. Amostras convencionais foram coletadas e fixadas momentos antes dos processos de coloração das amostras em meios líquidos, para que se estabelecesse um padrão comparativo nas análises do desempenho dos meios líquidos na conservação celular.

#### 4.2.2.1.3 Análises citológicas

Analisou-se as amostras de citologia oral em meio líquido em relação à coloração do núcleo, visualização de microrganismos, celularidade, sobreposição, presença de artefatos (bolhas, precipitados de corantes, estruturas não condizentes com o material analisado), coloração do citoplasma, preservação de bordo celular. Amostras que apresentaram quantidade significativa de células deformadas e ou arrebitadas ou com estrutura da cromatina prejudicada foram consideradas insatisfatórias e excluídas da avaliação preliminar para avaliação.

Após a fase de experimentos preliminares, selecionou-se os meios líquidos 1, 29 e 55 para a próxima fase de experimentos, em material citológico cervicovaginal.

Sequência de cubas	Tempo
Etanol a 80%	2 minutos
Etanol a 70%	2 minutos
Etanol a 50%	2 minutos
Água destilada	2 minutos
Hematoxilina de Harris	45 segundos
Água corrente	10 minutos
Etanol a 50%	2 minutos
Etanol a 70%	2 minutos
Etanol a 80%	2 minutos
Orange G	2 minutos
Etanol absoluto	2 minutos
Etanol absoluto	2 minutos
Eosina Amarelada 36	2 minutos
Etanol absoluto	2 minutos
Etanol absoluto	2 minutos
Etanol absoluto	2 minutos
Xilol	2 minutos
Xilol	2 minutos

QUADRO 3 - COLORAÇÃO SEGUNDO PAPANICO-  
LAOU MODIFICADA\*

NOTA: \*Newprov

#### 4.2.2.2 Testes preliminares com material citológico cervicovaginal

Coletou-se material citológico cervicovaginal de 19 voluntárias. Do total, 3 amostras foram coletadas para a realização de testes de conservação celular dos meios 1, 29, 55, selecionados anteriormente nos testes preliminares com células de mucosa oral. Após essa etapa, optou-se por prosseguir os estudos com o meio 55.

Posteriormente, coletou-se 16 amostras para testar o desempenho na conservação celular de novas composições de meios líquidos (Quadro 4), após 3 dias de conservação à temperatura ambiente.

Meio líquido	Etanol (ml/dl)	Formaldeído (ml/dl)	Metanol (ml/dl)	Ácido acético (ml/dl)	Isopropanol (ml/dl)	NaCl 9 g/l	Tampão P 10 mmole/l pH 7,04
1	99,5	-	-	-	-		
29	-	1	1	-	-		X
55	-	1	-	-	1		X
112	30	1	-	0,3	-		X
113	97	1	-	-	2		X
114	-	1	1	-	-		X
115	77	1	-	-	22		X
116	-	-	-	-	80		X
117	-	1	-	-	1	X	
118	-	1	-	-	20	X	
119	90	1	-	-	1	X	
120	20	1	1	-	1		X
121	20	3	1	-	1		X
122	20	1	-	-	1		X
123	20	3	-	-	1		X
124	50	1	1	-	1		X
125	10	1	1	-	1		X
126	50	1	1	-	10		X
127	-	1	-	-	20		X

QUADRO 4 – COMPOSIÇÕES DE MEIOS LÍQUIDOS A SEREM TESTADOS PRELIMINARMENTE PARA ESTUDOS CITOLÓGICOS EM MATERIAL DE MUCOSA CERVICOVAGINAL

NOTA: \* Concentrações dos soluções reagentes utilizadas. Et-etanol 99,5 % (ml/dl); Form-formaldeído 37% (ml/dl); Met-metanol 99,9% (ml/dl); Ác.Ac - ácido acético 99,9% (ml/dl); Isop-isopropanol 99,9% (ml/dl); TP-tampão fosfato 10 mmoles/l pH 7,4; H<sub>2</sub>O P- água purificada tipo 1.

#### 4.2.2.2.1 Coleta do material citológico cervicovaginal

No momento da coleta, cada voluntária foi orientada a vestir um avental descartável e tomar a posição ginecológica. Em seguida, introduziu-se cuidadosamente um espéculo descartável na cavidade vaginal, de modo que as paredes da vagina fossem afastadas e permitissem a visualização do colo do útero. Introduziu-se, então, uma espátula de Ayre no canal vaginal, coletando-se células com um movimento rotacional de 360° e depositando-as em lâmina de microscopia. Logo após, introduziu-se uma escova cônica no canal cervical, fazendo-se a raspagem por meio de um movimento giratório de 360°, e depositando-se o material colhido em lâmina de microscopia. Transferiu-se o material remanescente na escova para um tubo plástico tipo Falcon contendo 2 ml de meio líquido em teste.

#### 4.2.2.2.2 Processamento das amostras

Processou-se as amostras de acordo com o item 4.2.2.1.2

#### 4.2.2.2.3 Análises citológicas

Analisou-se as amostras de citologia cervicovaginal em meio líquido em relação a: coloração do núcleo, visualização de microrganismos, celularidade, sobreposição celular, coloração do citoplasma e preservação de bordo celular. Amostras que apresentaram quantidade significativa de células deformadas e ou arrebitadas ou com estrutura da cromatina prejudicada foram consideradas insatisfatórias e excluídas da avaliação preliminar para avaliação.

Após as análises, optou-se por prosseguir os testes utilizando-se apenas os meios 55 e 122, doravante denominados IFP e EtIFP, respectivamente, com os quais se obteve os melhores resultados.

#### 4.2.3 Estudo de Amostras Citológicas Cervicovaginais Preservadas em Meios Líquidos IFP e EtIFP em Comparação a Amostras de Citologia Convencional e de Citologia em Meio Líquido Comercial SurePath (BD)

O estudo das amostras citológicas preparadas com as metodologias propostas foi realizado de acordo com o Fluxograma apresentado na Figura 4.



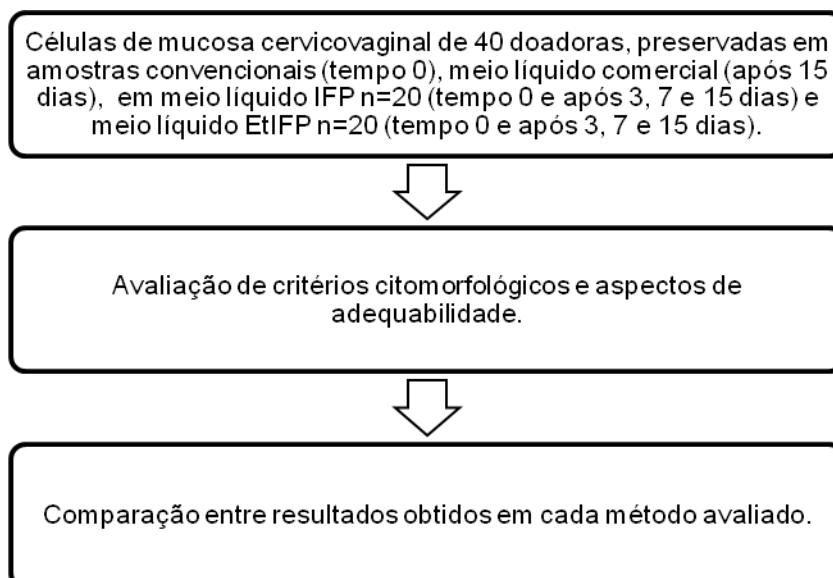


FIGURA 4- FLUXOGRAMA DOS TESTES DE ESTUDOS DE AMOSTRAS CITOLÓGICAS PRESERVADAS EM MEIOS LÍQUIDOS IFP E ETIFP EM COMPARAÇÃO A AMOSTRAS DE CITOLOGIA CONVENCIONAL E DE CITOLOGIA EM MEIO LÍQUIDO COMERCIAL SUREPATH

FONTE: A autora.

Testou-se os meios 55 e 122 (IFP e EtIFP), selecionados após os testes preliminares, empregando-se material citológico de 40 voluntárias com idades de 19 a 30 anos, sendo 20 voluntárias para cada meio, coletando-se 3 amostras de cada voluntária para cada método: convencional, meio líquido em teste (IFP ou EtIFP) e meio líquido comercial SurePath, totalizando 120 amostras.

#### 4.2.3.1 Coleta, processamento e análise das amostras citológicas cervicovaginais

Procedeu-se a coleta para citologia convencional e para os meios líquidos em estudo, como descrito no subitem 4.2.2.2.1. Repetiu-se o procedimento com uma nova escova cônica, transferindo-se a amostra citológica para o meio comercial (SurePath), seguindo-se com o transporte para processamento das amostras e confecção das lâminas. Enviou-se as amostras mantidas em meio comercial para processamento em um laboratório de Citologia Clínica, em São Paulo - SP. Processou-se e analisou-se as demais amostras no Laboratório de Citologia Clínica do Curso de Farmácia da UFPR.

Processou-se os materiais citológicos em citologia convencional e nos meios líquidos IFP e EtIFP de acordo com Machado e colaboradores (2008), com modificações, como descrito no item 4.2.2.1.2. Para tais amostras, avaliou-se o estado de conservação celular por análises nos tempos 0, 3, 7 e 15 dias, à temperatura ambiente.

Amostras em meio líquido SurePath foram processadas de acordo com o descrito no Anexo 2. O processamento foi realizado após 15 dias de conservação celular, à temperatura ambiente. Posteriormente, a equipe do laboratório reenviou estas lâminas para o laboratório de Citologia da UFPR para análise citológica e comparação do desempenho da conservação celular com os meios líquidos em teste.

#### 4.2.3.2 Análises citológicas

Realizou-se análises microscópicas para avaliar: adequabilidade e qualidade das amostras, presença de células escamosas superficiais, intermediárias e parabasais, células metaplásicas, células endocervicais, leucócitos polimorfonucleares, histiócitos, e hemácias, intensidade e tonalidade da coloração do citoplasma e do núcleo, distribuição e granulosidade da cromatina, relação núcleo/citoplasma, presença de alterações reativas e degenerativas, alterações de lesões intraepiteliais ou neoplásicas, presença de microrganismos normais e patológicos.

Foram estabelecidas comparações de adequação das amostras, tipos celulares observados, presença de microrganismos, alterações celulares reativas, reparativas, pré-neoplásicas e neoplásicas e resultado final da análise citológica entre as metodologias: meio líquido comercial, método convencional e meios líquidos estudados nesta pesquisa.

Todas as análises foram realizadas por 3 citologistas individualmente. Utilizou-se para as análises os critérios citomorfológicos da literatura (CIBAS e DUCATMAN, 1996; BIBBO, 1997; MEISELS e MORIN, 1997; KOSS e MELAMED, 2005; SOLOMON e NAYAR, 2005). Resultados divergentes foram discutidos pelos três citologistas, até o estabelecimento de um consenso.

#### 4.2.3.2.1 Adequação da Amostra

Para cada amostra analisada, observou-se os critérios de adequação da amostra: presença de células deformadas, presença de dobramentos celulares, citólise, sobreposição celular, presença de células arrebatadas e obscurecimento por leucócitos e ou microrganismos, atribuindo-se a cada critério uma das classificações: presença irrelevante, pouco, moderado e muito. Também foram analisados aspectos de coloração do núcleo, visualização da estrutura da cromatina, coloração do citoplasma e celularidade, atribuindo-lhes as seguintes classificações: satisfatório ótimo, satisfatório irregular e insatisfatório.

Amostras insatisfatórias foram relatadas e quantificadas para cada metodologia utilizada na coleta do material citológico.

#### 4.2.3.2.2 Tipos celulares

Relatou-se a presença de células escamosas superficiais, intermediárias, parabasais e basais, células glandulares endocervicais, células metaplásicas, leucócitos polimorfonucleares, histiócitos e hemácias, avaliando-se sua quantidade em cruzes (+, ++, +++ ou ++++), para estabelecer comparações entre as metodologias empregadas: convencional, meio líquido comercial e meios líquidos IFP e EtIFP, em relação aos tipos celulares encontrados.

#### 4.2.3.2.3 Presença de microrganismos

A análise da presença de microrganismos foi realizada em todas as amostras, relatando-se os achados de microrganismos morfolologicamente compatíveis com bacilos de Döderlein, flora bacilar, flora cocóide, flora mista, *Gardnerella vaginalis*, *Candida* spp., *Leptotrix* spp, comparando-se a detecção dos microrganismos nas diferentes metodologias de coleta: convencional, meio líquido comercial e meios líquidos IFP e EtIFP.

#### 4.2.3.2.4 Alterações reativas, reparativas, degenerativas, pré-neoplásicas e neoplásicas

Analizou-se a presença de alterações como: pseudoeosinofilia, metacromasia, vacuolização, halo perinuclear, grânulos querato-hialinos, apagamento de bordos citoplasmáticos, coilocitose, hiperqueratose, paraqueratose, homogenização da cromatina, espessamento de bordos nucleares, cariorréxis, edema nuclear, binucleação, multinucleação, cariopícnose, cariólise, citólise, hipercromasia, aumento da relação núcleo/citoplasma, contorno irregular do núcleo, pleomorfismo celular, anisonucleose, padrão anormal de agrupamentos celulares, cariomegalia, distribuição irregular da cromatina, espessamento irregular da membrana nuclear, mitoses anormais, canibalismo, disqueratose e diátese tumoral, comparando a detecção das alterações nas diferentes metodologias de coleta: convencional, meio líquido comercial SurePath e meios líquidos IFP e EtIFP.

#### 4.2.3.3 Elaboração de laudos citológicos

Elaborou-se laudos citológicos de todas as amostras, segundo o Sistema Bethesda 2001, comparando-se os resultados obtidos com as diferentes metodologias de coleta convencional, meio líquido comercial SurePath e meios líquidos IFP e EtIFP.

#### 4.2.4 Análise Estatística

Aplicou-se os testes estatísticos utilizando teste Z para duas proporções de categorias mutuamente exclusivas, com índice de confiabilidade de 0,05 para comparação da presença dos diferentes tipos celulares e presença de microrganismos nas metodologias convencional e nos meios líquidos SurePath, IFP e EtIFP.

#### 4.2.5 Seguimento das Voluntárias

A todas as participantes que doaram material cervicovaginal foi fornecido um laudo por escrito do exame citológico, após análise realizada e revisada por três citologistas do Laboratório de Citologia do Curso de Farmácia da UFPR. Esses resultados foram liberados e assinados por um citologista e tiveram validade de triagem.

As mulheres cujo resultado do exame indicou a necessidade de acompanhamento ou tratamento, ou seja, apresentaram resultado citológico com alterações pré-neoplásicas ou neoplásicas, bem como a presença de microrganismos morfológicamente compatíveis com *Gardnerella vaginallis*, *Candida* spp, *Leptotrix* spp, além de efeitos citopáticos específicos de HPV, foram devidamente instruídas a procurar atendimento médico.

## 5 RESULTADOS

Os resultados dos estudos sobre a preservação de células de mucosa oral e cervicovaginal estão apresentados de acordo com a cronologia dos experimentos realizados, divididos em testes preliminares com células de mucosa oral e de mucosa cervicovaginal em 127 diferentes meios líquidos; e estudos com células de mucosa cervicovaginal em dois meios líquidos selecionados nos testes preliminares, em comparação a amostras de citologia convencional e em meio líquido comercial.

### 5.1 TESTES PRELIMINARES COM CÉLULAS DE MUCOSA ORAL

O Quadro 5 apresenta os resultados das análises de adequabilidade das amostras preservadas nos meios líquidos 1, 10, 23, 26, 29, 32, 55 e 56 após 3, 5 e 10 dias de preservação, com os quais se obteve as melhores avaliações nos testes realizados com as 111 composições diferentes testadas com células de mucosa oral (Quadro 2). Os outros meios, em cujas amostras se observou quantidade considerável de células arrebatadas e deformadas e ou não se conseguiu discriminar a estrutura da cromatina, foram eliminados do estudo.

	Células Arrebatadas e ou Deformadas			Estrutura da Cromatina		
Meios	3 d	5 d	10 d	3 d	5 d	10 d
<b>1</b>	<b>RA</b>	<b>PO</b>	<b>PO</b>	<b>SR</b>	<b>SR</b>	<b>SR</b>
<del>10</del>	MO	MO	<del>MU</del>	SR	SR	<del>IN</del>
<del>23</del>	MO	PO	<del>MU</del>	SR	SR	SR
<del>26</del>	MO	MO	<del>MU</del>	SR	SR	SR
<b>29</b>	<b>PO</b>	<b>PO</b>	<b>PO</b>	<b>SO</b>	<b>SO</b>	<b>SO</b>
Convencional	PO	PO	PO	SO	SO	SO
<del>32</del>	PO	PO	PO	SO	SO	<del>IN</del>
<del>41</del>	PO	PO	PO	SR	<del>IN</del>	<del>IN</del>
<b>55</b>	<b>RA</b>	<b>RA</b>	<b>PO</b>	<b>SO</b>	<b>SO</b>	<b>SO</b>
Convencional	PO	PO	PO	SO	SO	SO
<del>56</del>	PO	PO	MO	SO	SO	<del>IN</del>
Convencional	PO	PO	PO	SR	SR	SO

QUADRO 5 - TESTES PRELIMINARES: AVALIAÇÃO DA ADEQUABILIDADE DE AMOSTRAS CITOLÓGICAS DE MUCOSA ORAL APÓS 3, 5 e 10 DIAS DE CONSERVAÇÃO NOS MEIOS LÍQUIDOS 1,10, 23, 26, 29, 32, 55 ou 56, EM COMPARAÇÃO À CITOLOGIA CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU DE CADA BATERIA CORRESPONDENTE AOS EXPERIMENTOS

NOTA: meio 1 - etanol 99,5 ml/dl; meio 10 - glutaraldeído 1 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L pH 7,4; meio 23 - Isopropanol 80 ml/dl e água purificada tipo 1; meio 26 - etanol 30 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L pH 7,4; meio 29 - formaldeído 1 ml/dl, metanol 1 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L pH 7,4; meio 32 - formaldeído 1 ml/dl, metanol 1 ml/dl, ácido acético 0,3 ml/dl e água purificada tipo 1; meio 41 - metanol 1 ml/dl, ácido acético 0,3 ml/dl e água purificada tipo 1; meio 55 - formaldeído 1 ml/dl, isopropanol 1 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L pH 7,4; meio 56 - formaldeído 1 ml/dl, isopropanol 3 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L pH 7,4; Conv - convencional de Papanicolaou; 3 d - 3 dias; 5 d - 5 dias; 10 d - 10 dias; RA - raros; PO - pouco; MO - moderado; MU - muito; SO - satisfatório ótimo; SR - satisfatório regular; IN - insatisfatório; os meios líquidos eliminados e as características citológicas de insatisfatoriedade estão representados de forma tachada.

O Quadro 6 apresenta resultados da avaliação da qualidade de amostras de mucosa oral após 3 dias de conservação nos meios líquidos 1,10, 23, 26, 29, 32, 55 e 56.

Meio líquido	Coloração núcleo	Microrganismos	Celularidade	Coloração citoplasma	Formato celular	Bordo celular	Sobreposição	Artefatos
1	SR	SO	SR	SR	SO	SO	PO	PO
10	SO	SR	SR	SR	SR	SR	RA	MO
23	SR	SO	SO	SR	SR	SR	PO	PO
26	SR	SR	SO	SR	SR	SR	MU	PO
29	SO	SO	SO	SO	SR	SO	PO	PO
Conv	SO	SO	SO	SO	SR	SR	MO	PO
32	SO	SO	SR	SR	SR	SO	PO	PO
41	SR	SO	SO	SR	SR	SR	MO	MO
55	SO	SO	SO	SO	SO	SO	RA	NO
Conv	SO	SO	SR	SR	SR	SO	PO	PO
56	SO	SO	SO	SO	SR	SO	PO	MO
Conv	SR	SO	SR	SO	SR	SO	MO	RA

QUADRO 6 - TESTES PRELIMINARES: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE CITOLÓGICA DE AMOSTRAS DE MUCOSA ORAL APÓS 3 DIAS DE CONSERVAÇÃO NOS MEIOS LÍQUIDOS 1, 10, 23, 26, 29, 32, 55, 56, EM COMPARAÇÃO À CITOLOGIA CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU DE CADA BATERIA CORRESPONDENTE AOS EXPERIMENTOS

NOTA: SO – satisfatório ótimo; SR – satisfatório regular; IN – insatisfatório; RA - raros; PO – pouco; MO – moderado; MU – muito; meio 1 – etanol 99,5 ml/dl; meio 10 – glutaraldeído 1 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L pH 7,4; meio 23 – Isopropanol 80 ml/dl e água purificada tipo 1; meio 26 – etanol 30 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L pH 7,4; meio 29 – formaldeído 1 ml/dl, metanol 1 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L pH 7,4; meio 32 – formaldeído 1 ml/dl, metanol 1 ml/dl, ácido acético 0,3 ml/dl e água purificada tipo 1; meio 41 – metanol 1 ml/dl, ácido acético 0,3 ml/dl e água purificada tipo 1; meio 55 – formaldeído 1 ml/dl, isopropanol 1 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L pH 7,4; meio 56 – formaldeído 1 ml/dl, isopropanol 3 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L pH 7,4; Conv – convencional de Papanicolaou.

Na avaliação após 5 dias de preservação, excluiu-se os meios 41 e 56, de acordo com os critérios adotados. No Quadro 7 são apresentadas as avaliações de qualidade das amostras preservadas nos meios líquidos 1, 10, 23, 26, 29, 32 e 55, após 5 dias de conservação. A partir dos testes realizados após 10 dias de preservação, excluiu-se também os meios 10, 23, 26 e 32. Os resultados das avaliações citológicas dos meios 1, 29 e 55, após 10 dias de preservação, estão representados no Quadro 8. A Figura 5 apresenta o aspecto morfológico de células escamosas de mucosa oral no tempo 0 e após 3, 7 e 15 dias de conservação celular.



Meio Líquido	Coloração Núcleo	Microrganismos	Celularidade	Coloração citoplasma	Formato celular	Bordo celular	Sobreposição	Artefatos
1	SR	SO	SR	SR	SR	SO	MO	PO
10	SR	SR	SR	SR	SR	SR	PO	MO
23	SR	SO	SO	SO	SR	SR	MO	MO
26	SR	SO	SO	SO	SR	SR	PO	MO
29	SO	SO	SO	SO	SR	SO	MO	MO
Conv	SO	SO	SO	SO	SR	SR	MO	PO
32	SO	SO	SO	SR	SR	SO	PO	PO
55	SO	SO	SO	SO	SO	SO	PO	PO
Conv	SO	SO	SR	SO	SR	SO	PO	PO
56	SO	SO	SO	SO	SR	SR	PO	PO
Conv	SR	SO	SO	SO	SR	SO	PO	PO

QUADRO 7 – TESTES PRELIMINARES: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE CITOLÓGICA DE AMOSTRAS DE MUCOSA ORAL APÓS 5 DIAS DE CONSERVAÇÃO NOS MEIOS LÍQUIDOS 1, 10, 23, 26, 29, 32, 55, EM COMPARAÇÃO À CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU DE CADA BATERIA CORRESPONDENTE AOS EXPERIMENTOS

NOTA: SO - satisfatório ótimo; SR - satisfatório regular; IN - insatisfatório; RA - raros; PO – pouco; MO – moderado; MU – muito; meio 1 - etanol 99,5 ml/dl; meio 10 - glutaraldeído 1 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L pH 7,4; meio 23 - Isopropanol 80 ml/dl e água purificada tipo 1; meio 26 - etanol 30 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L pH 7,4; meio 29 – formaldeído 1 ml/dl, metanol 1 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L pH 7,4; meio 32 - formaldeído 1 ml/dl, metanol 1 ml/dl, ácido acético 0,3 ml/dl e água purificada tipo 1; meio 41 - metanol 1 ml/dl, ácido acético 0,3 ml/dl e água purificada tipo 1; meio 55 – formaldeído 1 ml/dl, isopropanol 1 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L pH 7,4; Conv – convencional de Papanicolaou.

Meio líquido	Coloração Núcleo	Microrganismos	Celularidade	Coloração Citoplasma	Formato Celular	Bordo Celular	Sobreposição	Artefatos
1	SR	SO	SR	SR	SR	SO	PO	PO
29	SO	SO	SO	SO	SR	SO	PO	MO
Conv	SO	SO	SO	SO	SR	SR	MO	PO
55	SR	SO	SO	SR	SR	SR	PO	PO
Conv	SO	SO	SO	SO	SO	SO	PO	RA

QUADRO 8 - TESTES PRELIMINARES: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE CITOLÓGICA DE AMOSTRAS DE MUCOSA ORAL APÓS 10 DIAS DE CONSERVAÇÃO NOS MEIOS LÍQUIDOS 1, 29 e 55, EM COMPARAÇÃO À CITOLOGIA CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU

NOTA: SO - satisfatório ótimo; SR - satisfatório regular; IN - insatisfatório; RA – raros; PO – pouco; MO – moderado; MU – muito; meio 1 - etanol 99,5 ml/dl; meio 29 – formaldeído 1 ml/dl, metanol 1 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L pH 7,4; meio 55 – formaldeído 1 ml/dl, isopropanol 1 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L pH 7,4; Conv – convencional de Papanicolaou.

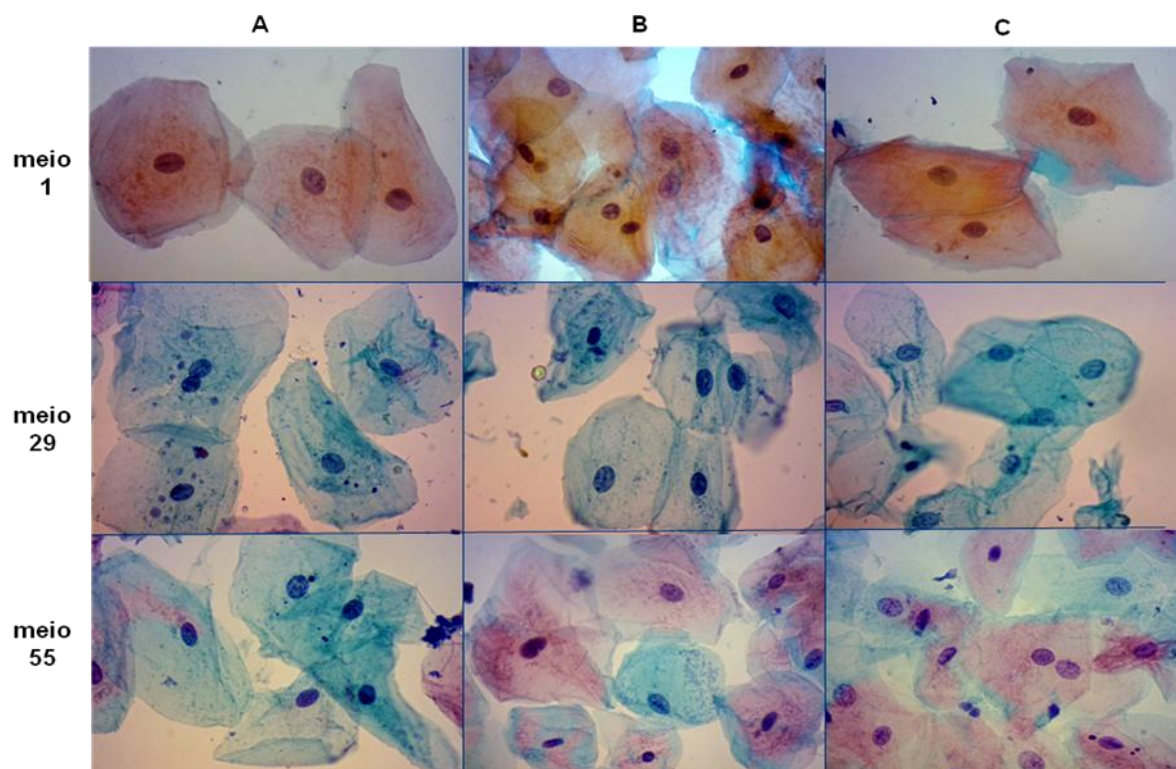


FIGURA 5 - FOTOMICROGRAFIAS DE CÉLULAS DE MUCOSA ORAL APÓS 3, 5 e 10 DIAS DE CONSERVAÇÃO NOS MEIO LÍQUIDOS 1, 29 e 55

NOTA: A – após 3 dias de conservação celular; B – após 5 dias de conservação celular; C – após 10 dias de conservação celular; coloração de Papanicolaou (X400).

FONTE: A autora

## 5.2 TESTES PRELIMINARES COM CÉLULAS DE MUCOSA CERVICOVAGINAL

O Quadro 9 apresenta os resultados das análises de adequabilidade citológica de amostras preservadas nos meios 1, 29, 55, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126 e 127, com avaliações citológicas de material de mucosa cervicovaginal após 3 dias de preservação nos meios líquidos testados (Quadro 4). O Quadro 10 apresenta os resultados das análises de qualidade citológica das mesmas amostras após 3 dias de conservação. Após as análises, optou-se por prosseguir os testes utilizando-se apenas os meios 55 e 122, que foram então denominados IFP e EtIFP, respectivamente (Figura 6).

Meio	Células Arrebatadas e ou Deformadas	Estrutura da Cromatina
4	MU	SR
29	RA	SR
55	RA	SO
112	MO	IN
113	MU	SR
114	MU	IN
115	PO	IN
116	PO	IN
117	RA	SO
118	RA	IN
119	PO	SO
120	PO	IN
121	RA	IN
122	RA	SO
123	PO	SO
124	RA	SO
125	PO	SO
126	PO	SO
127	RA	SO

QUADRO 9 - TESTES PRELIMINARES: AVALIAÇÃO DA ADEQUABILIDADE DE AMOSTRAS CITOLÓGICAS DE MUCOSA CÉRVICO-VAGINAL APÓS 3 DIAS DE CONSERVAÇÃO NOS MEIOS LÍQUIDOS 1, 29, 55, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126 E 127

NOTA: 1 - etanol 99,5 ml/dl; 29 – Formaldeído 1 ml/dl, metanol 1 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L pH 7,4; 55 – Formaldeído 1 ml/dl, isopropanol 1 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L pH 7,4; 112 – Etanol 30 ml/dl, formaldeído 1 ml/dl; ácido acético 0,3 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L pH 7,4; 113 – Etanol 97 ml/dl, isopropanol 2 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L; 114 – Formaldeído 1 ml/dl, metanol 1 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L; 115 – Etanol 77 ml/dl, formaldeído 1 ml/dl, isopropanol 22 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L; 116 – Isopropanol 80 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L; 117 - Formaldeído 1 ml/dl, isopropanol 1 ml/dl e solução salina 0,9%; 118 – Formaldeído 1 ml/dl, isopropanol 20 ml/dl e solução salina 0,9%; 119 – Etanol 90 ml/dl, formaldeído 1 ml/dl, isopropanol 1 ml/dl e solução salina 0,9%; 120 – Etanol 20 ml/dl; formaldeído 1 ml/dl, metanol 1 ml/dl, isopropanol 1 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L; 121 - Etanol 20 ml/dl; formaldeído 3 ml/dl, metanol 1 ml/dl, isopropanol 1 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L; 122 - Etanol 20 ml/dl; formaldeído 1 ml/dl, isopropanol 1 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L; 123 - Etanol 20 ml/dl; formaldeído 3 ml/dl, isopropanol 1 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L; 124 - Etanol 50 ml/dl; formaldeído 1 ml/dl, metanol 1 ml/dl, isopropanol 1 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L; 125 - Etanol 10 ml/dl; formaldeído 1 ml/dl, metanol 1 ml/dl, isopropanol 1 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L; 126 - Etanol 50 ml/dl; formaldeído 1 ml/dl, metanol 1 ml/dl, isopropanol 10 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L; 127 - Etanol 50 ml/dl; formaldeído 1 ml/dl, metanol 1 ml/dl, isopropanol 20 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L; RA - raros; PO – pouco; MO – moderado; MU – muito; SO - satisfatório ótimo; SR - satisfatório regular; IN – insatisfatório; os meios líquidos eliminados e as características citológicas de insatisfatoriedade estão representados de forma tachada.

Meio Líquido	Coloração Núcleo	Microrganismos	Celularidade	Coloração Citoplasma	Formato Celular	Bordo Celular	Sobreposição	Artefatos
1	SO	SO	SO	SO	SR	SR	PO	MU
29	SO	SO	SO	SO	SO	SO	PO	PO
55	SO	SO	SO	SO	SO	SO	NO	NO
112	SO	SO	SO	SR	SR	SR	PO	MO
113	SR	SO	SO	SO	IN	IN	MO	MU
114	SR	SO	SO	SO	IN	IN	MO	MU
115	SR	SO	SO	SO	SR	SR	NO	MO
116	SR	SO	SO	SO	IN	IN	MO	MU
117	SO	SO	SO	SO	SO	SO	PO	NO
118	SR	SO	SO	SO	SO	SO	MO	PO
119	SO	SO	SO	SR	IN	SR	MO	MU
120	SR	SO	SO	SO	SO	SO	PO	PO
121	SR	SO	SO	SO	SO	SO	MO	NO
122	SO	SO	SO	SO	SO	SO	PO	NO
123	SO	SO	SO	SO	SO	SO	MO	PO
124	SO	SO	SO	SO	SO	SO	PO	NO
125	SO	SO	SO	SO	SR	SO	MO	PO
126	SO	SO	SO	SO	SR	SO	MO	PO
127	SO	SO	SO	SO	SR	SO	MO	NO

QUADRO 10 - TESTES PRELIMINARES: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE CITOLÓGICA DE AMOSTRAS DE MUCOSA CÉRVICO-VAGINAL APÓS 3 DIAS DE CONSERVAÇÃO NOS MEIOS LÍQUIDOS 1, 29, 55, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126 e 127

NOTA: 1 - etanol 99,5 ml/dl; 29 – Formaldeído 1 ml/dl, metanol 1 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L pH 7,4; 55 – Formaldeído 1 ml/dl, isopropanol 1 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L pH 7,4; 112 – Etanol 30 ml/dl, formaldeído 1 ml/dl; ácido acético 0,3 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L pH 7,4; 113 – Etanol 97 ml/dl, isopropanol 2 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L; 114 – Formaldeído 1 ml/dl, metanol 1 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L; 115 – Etanol 77 ml/dl, formaldeído 1 ml/dl, isopropanol 22 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L; 116 – Isopropanol 80 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L; 117 - Formaldeído 1 ml/dl, isopropanol 1 ml/dl e solução salina 0,9%; 118 – Formaldeído 1 ml/dl, isopropanol 20 ml/dl e solução salina 0,9%; 119 – Etanol 90 ml/dl, formaldeído 1 ml/dl, isopropanol 1 ml/dl e solução salina 0,9%; 120 – Etanol 20 ml/dl; formaldeído 1 ml/dl, metanol 1 ml/dl, isopropanol 1 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L; 121 - Etanol 20 ml/dl; formaldeído 3 ml/dl, metanol 1 ml/dl, isopropanol 1 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L; 122 - Etanol 20 ml/dl; formaldeído 1 ml/dl, isopropanol 1 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L; 123 - Etanol 20 ml/dl; formaldeído 3 ml/dl, isopropanol 1 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L; 124 - Etanol 50 ml/dl; formaldeído 1 ml/dl, metanol 1 ml/dl, isopropanol 1 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L; 125 - Etanol 10 ml/dl; formaldeído 1 ml/dl, metanol 1 ml/dl, isopropanol 1 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L; 126 - Etanol 50 ml/dl; formaldeído 1 ml/dl, metanol 1 ml/dl, isopropanol 10 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L; 127 - Etanol 50 ml/dl; formaldeído 1 ml/dl, metanol 1 ml/dl, isopropanol 20 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L; NO – não observado; PO – pouco; MO – moderado; MU – muito; SO - satisfatório ótimo; SR - satisfatório regular; I – insatisfatório.

### 5.3 ESTUDO DE AMOSTRAS CITOLÓGICAS CERVICOVAGINAIS PRESERVADAS EM MEIOS LÍQUIDOS IFP E ETIFP EM COMPARAÇÃO A AMOSTRAS DE CITOLOGIA CONVENCIONAL E DE CITOLOGIA EM MEIO LÍQUIDO COMERCIAL SUREPATH (BD)

As Figuras 6 e 7 representam a avaliação da adequabilidade e da qualidade, respectivamente, de amostras citológicas de mucosa cervicovaginal pelos métodos de citologia convencional de Papanicolaou, meio líquido comercial SurePath (BD) e meio líquido IFP.

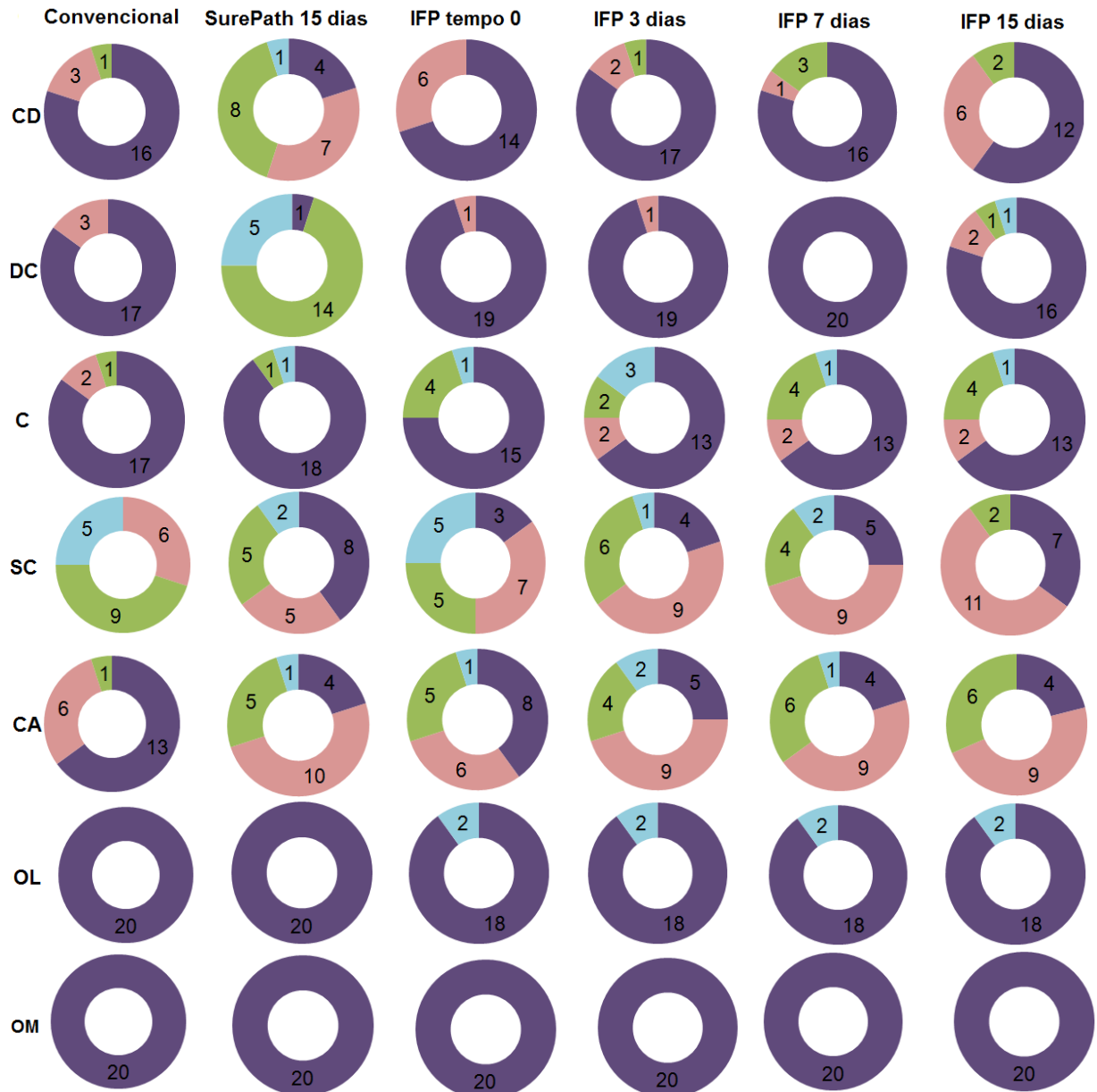


FIGURA 6 - AVALIAÇÃO DA ADEQUABILIDADE DE AMOSTRAS CITOLÓGICAS DE MUCOSA CERVICOVAGINAL POR CITOLOGIA CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU, EM MEIO LÍQUIDO COMERCIAL SUREPATH (BD) APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO E NO MEIO LÍQUIDO IFP NOS TEMPOS ZERO E DE 3, 7 E 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO

NOTA: frequências — presença irrelevante — pouco — moderado — muito; CD – presença de células deformadas; DC – presença de dobramentos celulares; C - citólise; SC – sobreposição celular; CA – presença de células arrebatadas; OL – obscurecimento por leucócitos; OM – obscurecimento por microrganismos (n=20).

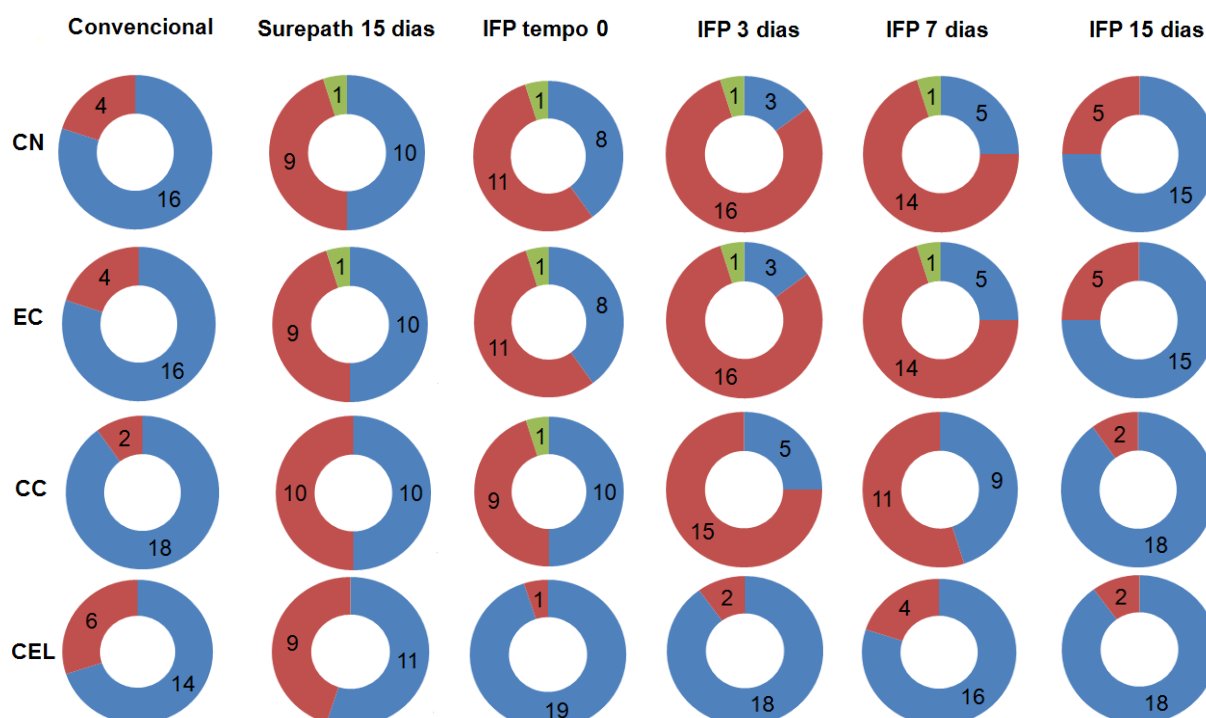


FIGURA 7 - AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE AMOSTRAS CITOLÓGICAS DE MUCOSA CERVICOVAGINAL POR CITOLOGIA CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU, EM MEIO LÍQUIDO COMERCIAL SUREPATH (BD) APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO E NO MEIO LÍQUIDO IFP NOS TEMPOS ZERO E DE 3, 7 E 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO

NOTA: frequências- satisfatório ótimo, satisfatório regular insatisfatório; CN – coloração do núcleo; EC - estrutura da cromatina; CC – coloração do citoplasma; CEL – celularidade (n=20).

As Figuras 8 e 9 representam a avaliação da adequabilidade e da qualidade, respectivamente, de amostras citológicas de mucosa cérvico-vaginal pelos métodos de citologia convencional de Papanicolaou, meio líquido comercial SurePath (BD) e meio líquido EtIFP.

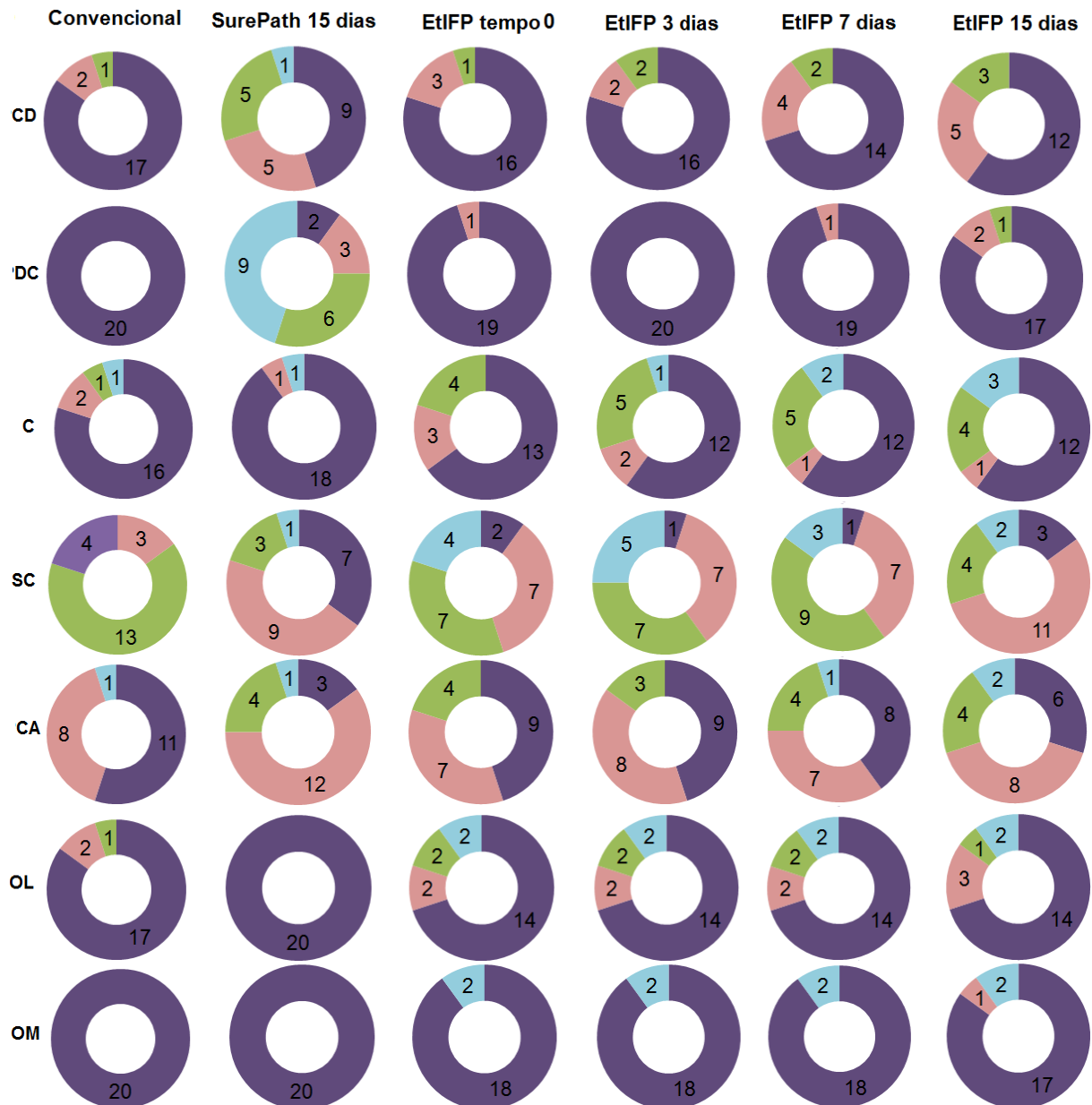


FIGURA 8: AVALIAÇÃO DA ADEQUABILIDADE DE AMOSTRAS CITOLÓGICAS DE MUCOSA CERVICOVAGINAL POR CITOLOGIA CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU, EM MEIO LÍQUIDO COMERCIAL SUREPATH (BD) APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO E NO MEIO LÍQUIDO EtIFP NOS TEMPOS ZERO E DE 3, 7 E 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO

NOTA: frequências presença irrelevante pouco moderado muito; CD – presença de células deformadas; DC – presença de dobramentos celulares; C - citólise; SC – sobreposição celular; CA – presença de células arrebitadas; OL – obscurecimento por leucócitos; OM – obscurecimento por microrganismos (n=20).



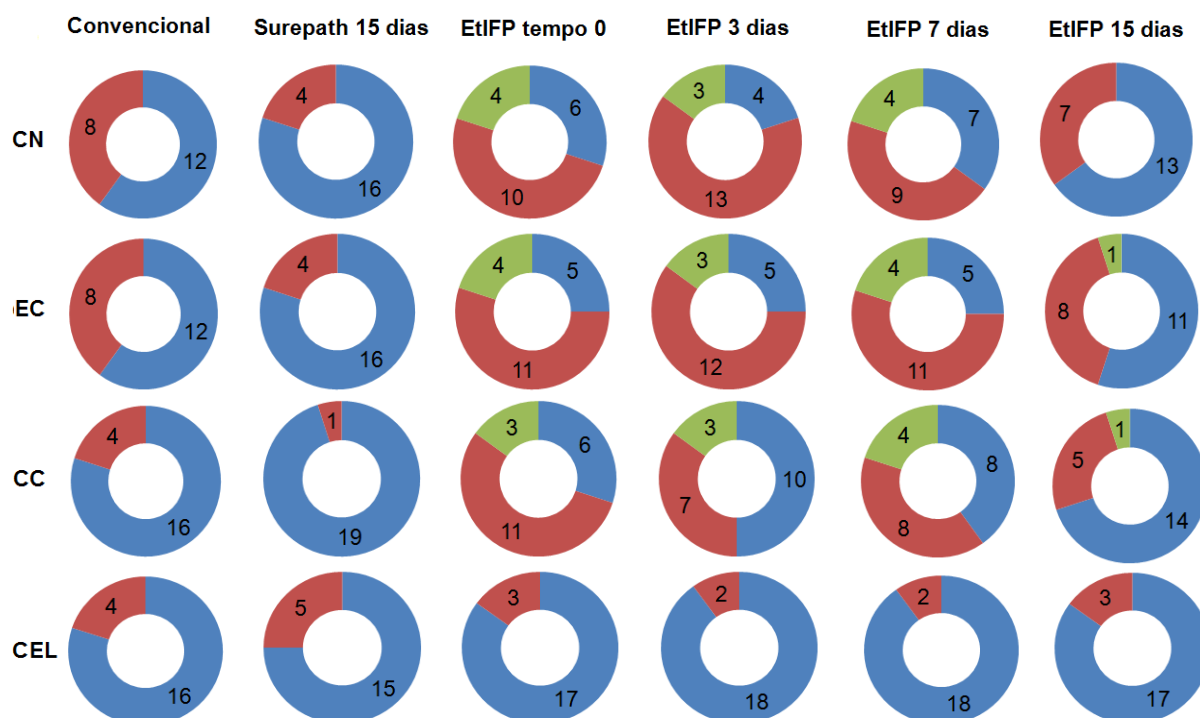


FIGURA 9 - AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE AMOSTRAS CITOLÓGICAS DE MUCOSA CERVICOVAGINAL POR CITOLOGIA CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU, EM MEIO LÍQUIDO COMERCIAL SUREPATH (BD) APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO E NO MEIO LÍQUIDO EtIFP NOS TEMPOS ZERO E DE 3, 7 E 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO

NOTA: frequências- satisfatório ótimo, satisfatório regular insatisfatório; CN – coloração do núcleo; EC - estrutura da cromatina; CC – coloração do citoplasma; CEL – celularidade (n=20).

A Figura 10 apresenta os resultados da avaliação da presença de tipos celulares observados na leitura citológica de amostras de mucosa cervicovaginal pelos métodos de citologia convencional de Papanicolaou e meio líquido IFP. Para os testes Z para duas proporções de categorias mutuamente exclusivas, não houve diferença estatística significativa entre as diferentes metodologias analisadas.

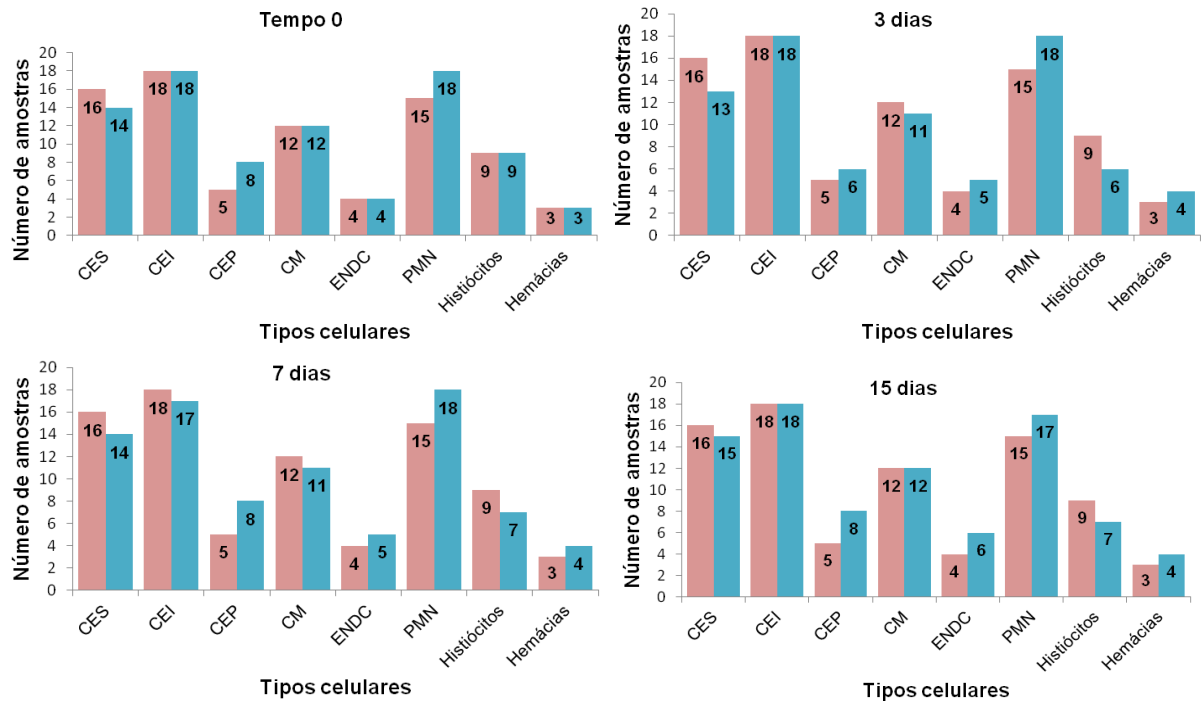


FIGURA 10 - PRESENÇA DE TIPOS CELULARES DA MUCOSA CERVICAL E DE LEUCÓCITOS POLIMORFONUCLEARES, HISTIÓCITOS E HEMÁCIAS EM AMOSTRAS DE MATERIAL CERVICOVAGINAL NO MÉTODO CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU E NO TEMPO ZERO E APÓS 3, 7 E 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO NO MEIO LÍQUIDO IFP

Nota: frequências – ■ convencional; ■ IFP; CES – células escamosas superficiais; CEI - células escamosas intermediárias; CEP - células escamosas parabasais; CM – células metaplásicas; ENDC – células endocervicais; PMN – leucócitos polimorfonucleares (n=18)

A Figura 11 apresenta resultados de avaliação da presença de tipos celulares observados na leitura citológica de amostras de mucosa cervicovaginal pelos métodos de citologia convencional de Papanicolaou e meio líquido EtIFP. Para os testes Z para duas proporções de categorias mutuamente exclusivas, não houve diferença estatística significativa entre as diferentes metodologias analisadas.

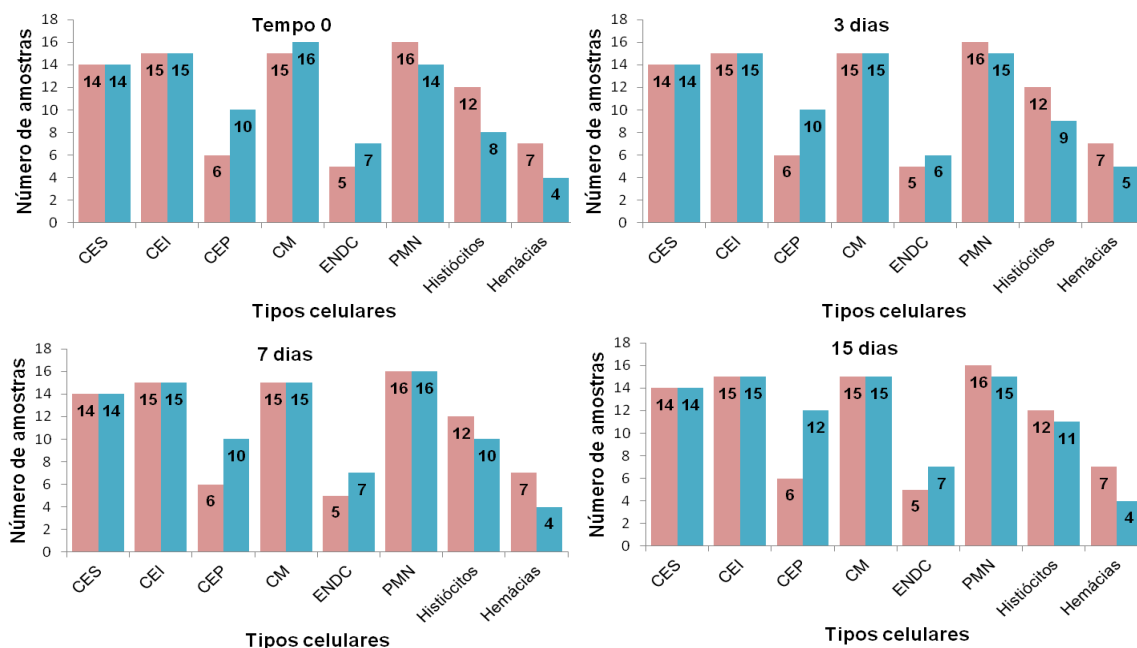


FIGURA 11 - PRESENÇA DE TIPOS CELULARES DA MUCOSA CERVICAL E DE LEUCÓCITOS POLIMORFONUCLEARES, HISTIÓCITOS E HEMÁCIAS EM AMOSTRAS DE MATERIAL CERVICOVAGINAL NO MÉTODO CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU E NO TEMPO ZERO E APÓS 3, 7 E 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO NO MEIO LÍQUIDO ETIFP

Nota: frequências – ■ convencional; ■ EtIFP; CES – células escamosas superficiais; CEI – células escamosas intermediárias; CEP – células escamosas parabasais; CM – células metaplásicas; ENDC – células endocervicais; PMN – leucócitos polimorfonucleares (n=16).

A Figura 12 apresenta uma comparação dos tipos celulares presentes em meio líquido IFP após 15 dias de conservação celular e em meio líquido comercial SurePath (BD). Também representa resultados de tipos celulares observados no meio EtIFP após 15 dias de preservação e no meio líquido SurePath após 15 dias de preservação celular. Para os testes Z para duas proporções de categorias mutuamente exclusivas, houve diferença estatística significativa entre as diferentes metodologias analisadas em: A)  $p = 0,023$  para presença de hemácias, sendo que o meio IFP apresentou maior proporção desse tipo celular; B)  $p = 0,021$  para presença de hemácias, sendo que o meio EtIFP apresentou maior proporção desse tipo celular.

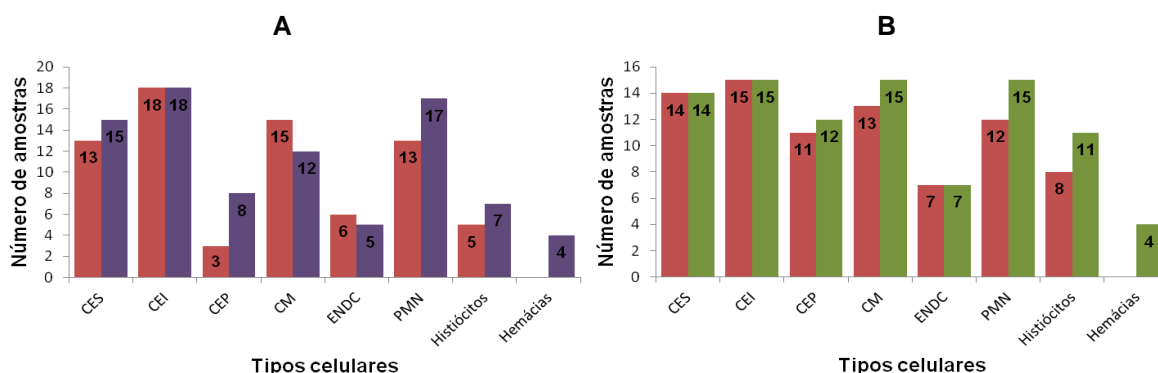


FIGURA 12 - PRESENÇA DE TIPOS CELULARES DA MUCOSA CERVICAL E DE LEUCÓCITOS POLIMORFONUCLEARES, HISTIÓCITOS E HEMÁCIAS EM AMOSTRAS DE MATERIAL CERVICOVAGINAL: (A) APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO NO MEIO LÍQUIDO IFP E APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO NO MEIO LÍQUIDO SUREPATH (BD) (B) APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO NO MEIO LÍQUIDO EtIFP E APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO NO MEIO LÍQUIDO SUREPATH (BD)

NOTA: frequências – SurePath após 15 dias IFP após 15 dias EtIFP após 15 dias; CES – células escamosas superficiais; CEI - células escamosas intermediárias; CEP - células escamosas parabasais; CM – células metaplásicas; ENDC – células endocervicais; PMN – leucócitos polimorfonucleares; A (n=18); B (n=16).

A Figura 13 apresenta os resultados da avaliação da presença de tipos celulares observados na leitura citológica de amostras de mucosa cérvico-vaginal pelos métodos de citologia em meio líquido IFP e meio líquido EtIFP nos tempos zero e após 3, 7 e 15 dias de conservação. Para os testes Z para duas proporções de categorias mutuamente exclusivas, não houve diferença estatística significativa entre nos diferentes tempos de preservação celular analisados, em ambos os meios líquidos.

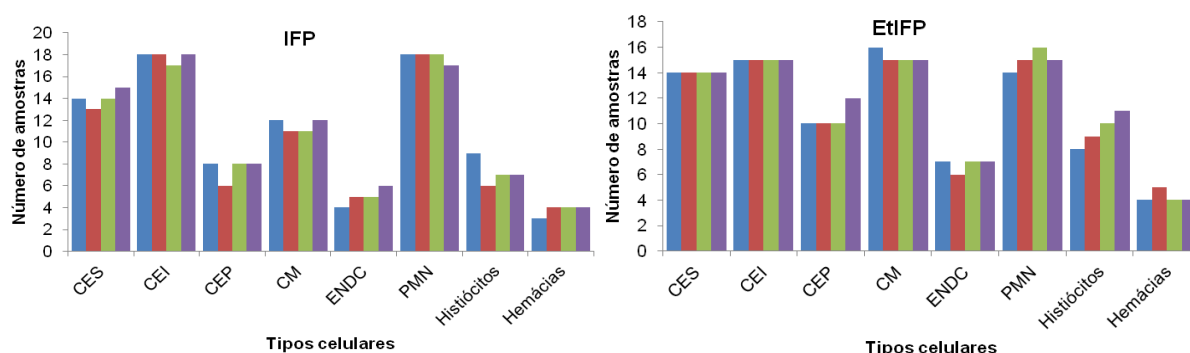


FIGURA 13 - PRESENÇA DE TIPOS CELULARES DA MUCOSA CERVICAL E DE LEUCÓCITOS POLIMORFONUCLEARES, HISTIÓCITOS E HEMÁCIAS EM AMOSTRAS DE MATERIAL CERVICOVAGINAL NO TEMPO ZERO E APÓS 3, 7 E 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO NO MEIO LÍQUIDO IFP E ETIFP

Nota: frequências – tempo 0 após 3 dias após 7 dias após 15 dias; CES – células escamosas superficiais; CEI - células escamosas intermediárias; CEP - células escamosas parabasais; CM – células metaplásicas; ENDC – células endocervicais; PMN – leucócitos polimorfonucleares; IFP (n=18); EtIFP (n=16)

A Figura 14 apresenta fotomicrografias de tipos celulares encontrados em amostras do mesmo indivíduo pelos métodos convencional, meio líquido SurePath, e meio líquido IFP, após 15 dias de conservação celular. A figura 15 apresenta os tipos celulares encontrados em amostras do mesmo indivíduo pelos métodos convencional, meio líquido SurePath após 15 dias de conservação celular, e meio líquido EtIFP, após 15 dias de conservação celular.

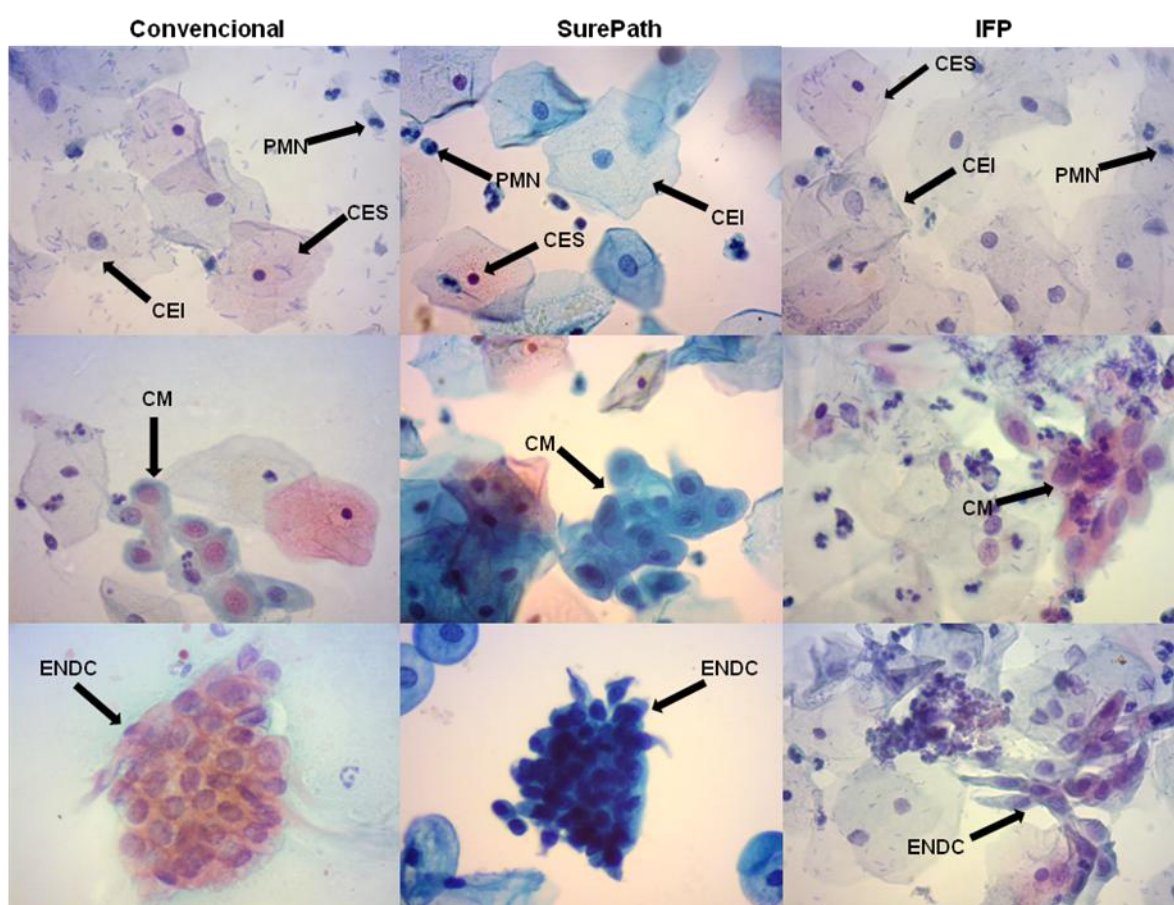


FIGURA 14 - FOTOMICROGRAFIAS DE TIPOS CELULARES OBSERVADOS EM MATERIAL CITOLÓGICO CERVICOVAGINAL PELA METODOLOGIA CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU, EM MEIO LÍQUIDO COMERCIAL SUREPATH (BD) APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO CELULAR E NO MEIO LÍQUIDO IFP, APÓS 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO CELULAR

NOTA: CES – células escamosas superficiais; CEI - células escamosas intermediárias; PMN – leucócitos polimorfonucleares; CM – células metaplásicas; ENDC – células endocervicais; coloração de Papanicolaou (X400).

FONTE: A autora



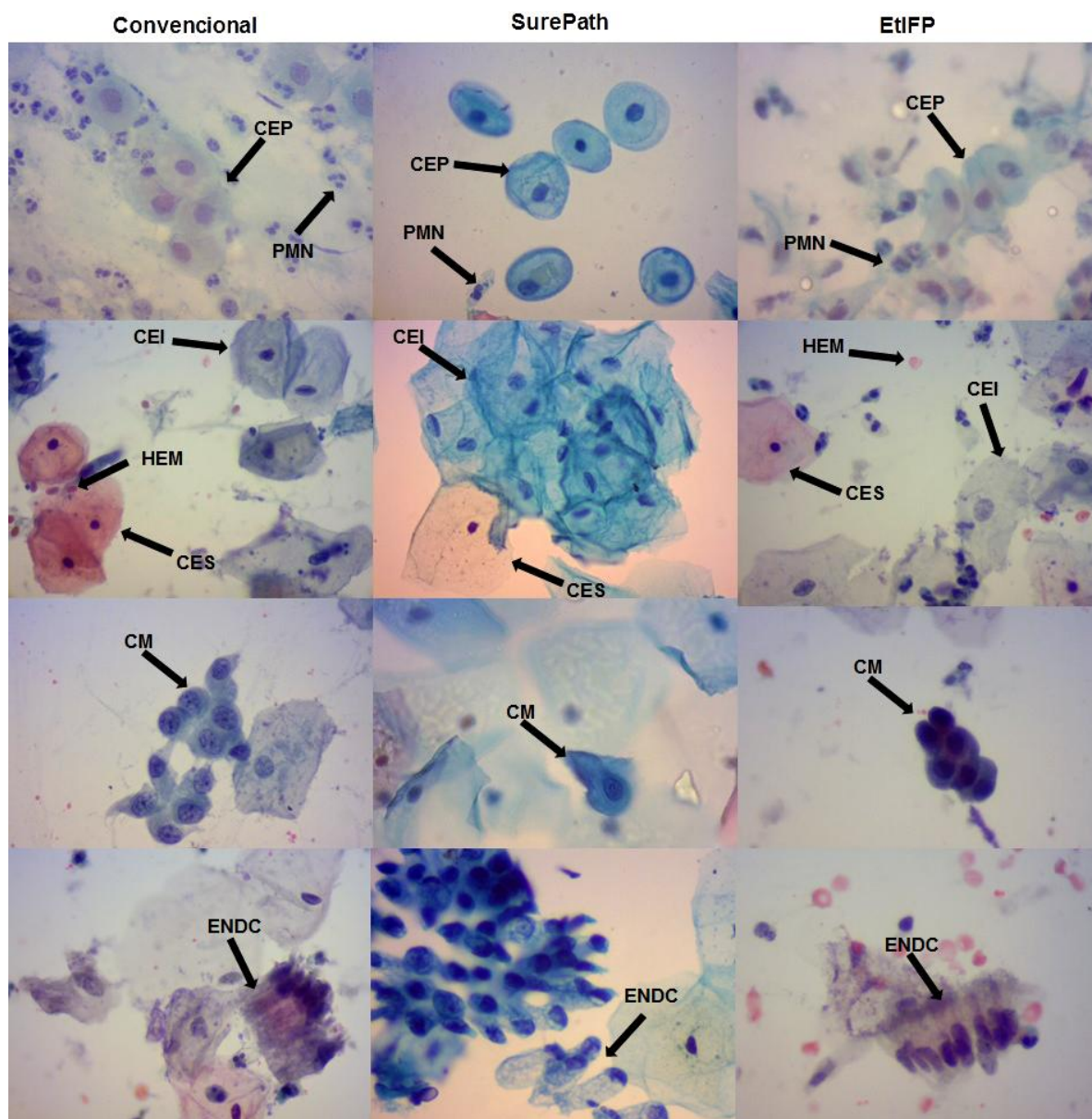


FIGURA 15 - FOTOMICROGRAFIAS DE TIPOS CELULARES OBSERVADOS EM MATERIAL CITOLÓGICO CERVICOVAGINAL PELA METODOLOGIA CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU, EM MEIO LÍQUIDO COMERCIAL SUREPATH (BD) APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO CELULAR E NO MEIO LÍQUIDO EtIFP, APÓS 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO CELULAR

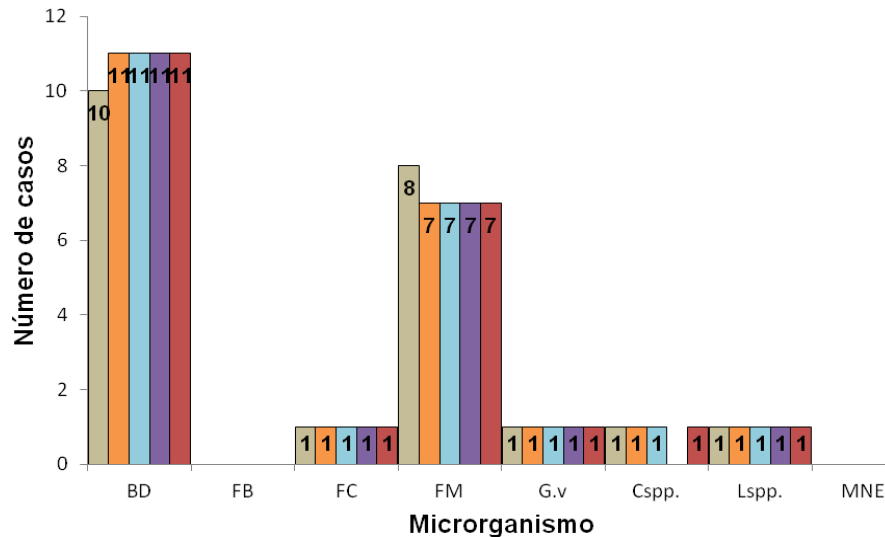
NOTA: CES – células escamosas superficiais; CEI - células escamosas intermediárias; CEP - células escamosas parabasais; CM – células metaplásicas; ENDC – células endocervicais; PMN – leucócitos polimorfonucleares; coloração de Papanicolaou (X400).

FONTE: A autora

A Figura 16 apresenta resultados das análises comparativas de presença de microrganismos em material citológico cervical pelo método convencional de Papanicolaou, em meio líquido IFP e em meio líquido comercial SurePath. Para os testes Z para duas proporções de categorias mutuamente exclusivas, houve diferença estatística significativa entre as diferentes metodologias analisadas em B)  $p = 0,025$  para microrganismos não encontrados, sendo que o meio líquido SurePath

apresentou maior proporção de eventos nos quais não se encontrou microrganismos.

**A**



**B**

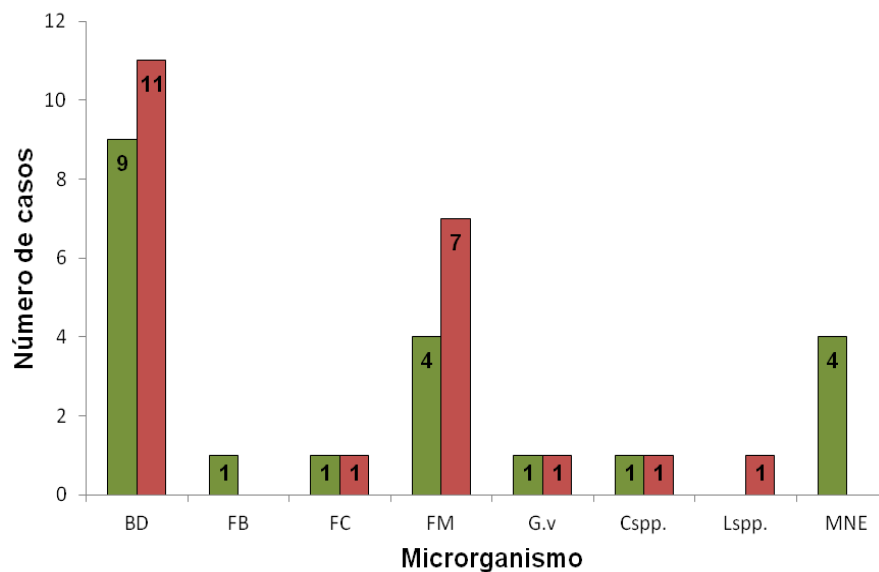
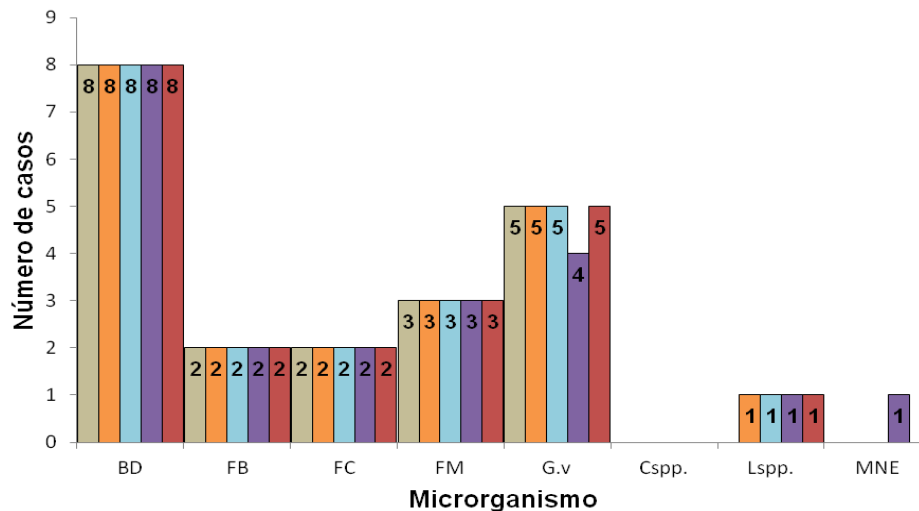


FIGURA 16 - PRESENÇA DE MICRORGANISMOS EM MATERIAL CITOLÓGICO DE MUCOSA CERVICAL EM: (A) MÉTODO CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU E NO TEMPO ZERO, APÓS 3, 7 E 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO IFP; (B) APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO NO MEIO LÍQUIDO IFP E APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO NO MEIO LÍQUIDO SUREPATH (BD)

NOTA: Frequências -  convencional;  IFP tempo 0;  IFP após 3 dias;  IFP após 7 dias;  IFP após 15 dias;  SurePath após 15 dias; BD – bacilos de Doderlein; FB – flora bacilar; FC – flora cocóide; FM – flora mista; G.v – *Gardnerella vaginalis*; Cspp – *Candida* spp; Lspp – *Leptotrix* spp; MNE – microrganismos não existentes(n=20).

A figura 17 apresenta resultados das leituras comparando a presença de microrganismos em material citológico cervical pelo método convencional de Papanicolaou, em meio líquido EtIFP e em meio líquido SurePath. Para os testes Z para duas proporções de categorias mutuamente exclusivas, não houve diferença estatística significativa entre as diferentes metodologias analisadas.

**A**



**B**

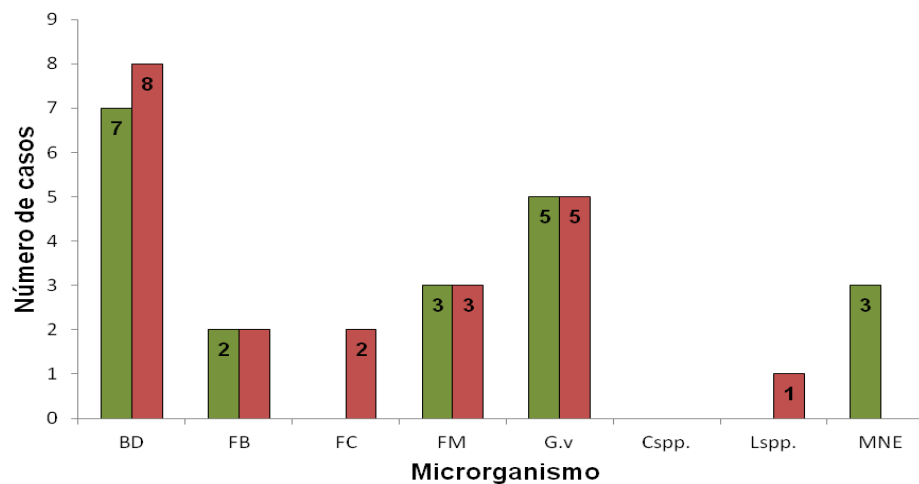








FIGURA 17 - PRESENÇA DE MICRORGANISMOS EM MATERIAL CITOLÓGICO DE MUCOSA CERVICAL EM: (A) MÉTODO CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU E NO TEMPO ZERO, APÓS 3, 7 E 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO ETIFP; (B) APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO NO MEIO LÍQUIDO ETIFP E APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO NO MEIO LÍQUIDO SUREPATH (BD)

NOTA: Frequências  convencional;  EtIFP tempo 0;  EtIFP após 3 dias;  EtIFP após 7 dias;  EtIFP após 15 dias;  SurePath após 15 dias; BD – bacilos de Doderlein; FB – flora bacilar; FC – flora cocóide; FM – flora mista; G.v – *Gardnerella vaginalis*; Cspp – *Candida* spp; Lspp – *Leptotrix* spp; MNE – microrganismos não existentes(n=20).



A Figura 18 apresenta fotomicrografias de microrganismos observados em amostras convencional, em meio comercial SurePath após 15 dias de conservação celular e meio líquido IFP, após 15 dias de conservação celular. Na figura 19 estão representadas fotomicrografias de microrganismos observados em amostras convencional, em meio comercial SurePath após 15 dias de preservação celular e meio líquido EtIFP, após 15 dias de conservação celular.

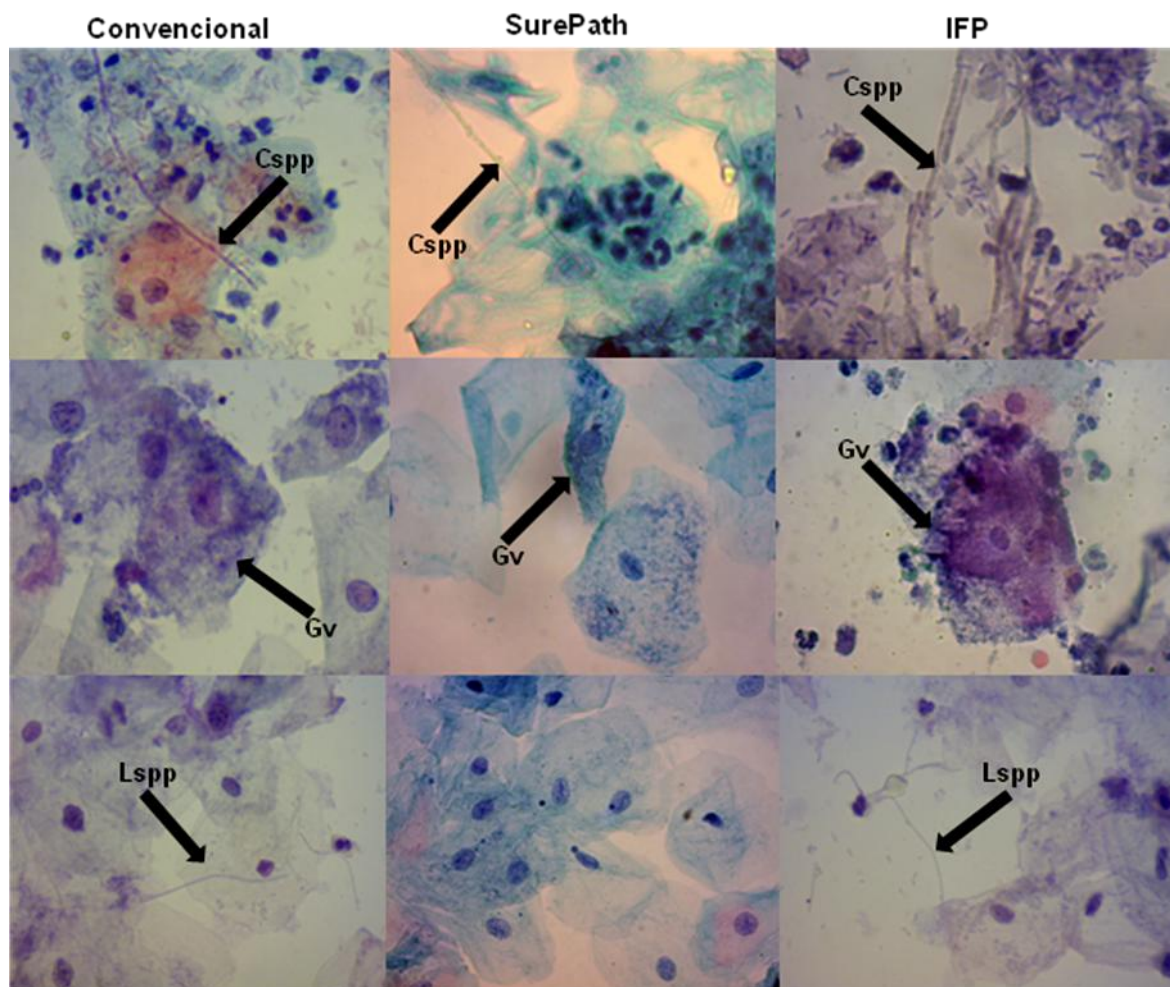


FIGURA 18 - FOTOMICROGRAFIAS DE MICRORGANISMOS OBSERVADOS EM MATERIAL CITOLÓGICO CERVICOVAGINAL PELA METODOLOGIA CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU, EM MEIO LÍQUIDO COMERCIAL SUREPATH (BD), APÓS 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO E EM MEIO LÍQUIDO IFP APÓS 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO

NOTA: G.v – *Gardnerella vaginalis*; Cspp – *Candida* spp.; Lspp – *Leptotrix* spp; coloração de Papanicolaou X400.

No meio SurePath não foram vistos *Leptotrix* spp.

FONTE: A autora

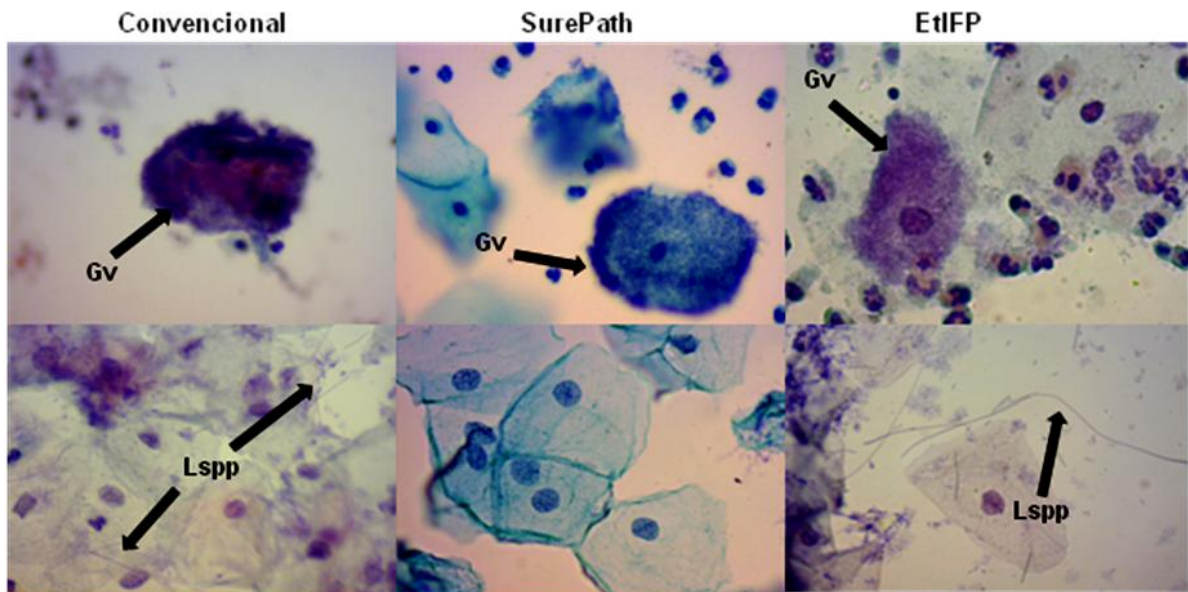


FIGURA 19 - FOTOMICROGRAFIAS DE MICRORGANISMOS OBSERVADOS EM MATERIAL CITOLÓGICO CERVICOVAGINAL PELA METODOLOGIA CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU, EM MEIO LÍQUIDO COMERCIAL SUREPATH (BD), APÓS 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO E EM MEIO LÍQUIDO ETIFP APÓS 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO

NOTA: G.v – *Gardnerella vaginalis*; Lspp – *Leptotrix* spp; coloração de Papanicolaou X400.

No meio SurePath não foram vistos *Leptotrix* spp.

FONTE: A autora

A Tabela 1 representa comparações entre coleta pelo método convencional de Papanicolaou, em meio líquido SurePath e em meio líquido IFP em relação a presença de alterações reativas, reparativas, degenerativas, pré-neoplásicas e neoplásicas em células de material cervicovaginal.

TABELA 1: PRESENÇA DE ALTERAÇÕES REATIVAS, REPARATIVAS, DEGENERATIVAS, PRÉ-NEOPLÁSICAS E NEOPLÁSICAS EM CÉLULAS DE MATERIAL CERVICOVAGINAL NO MÉTODO CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU, NO MEIO LÍQUIDO SUREPATH (BD) APÓS 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO E MEIO LÍQUIDO IFP NO TEMPO ZERO E APÓS 3, 7 E 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO

Alterações	Conv	SurePath	IFP tempo 0	IFP 3 dias	IFP 7 dias	IFP 15 dias
Pseudoeosinofilia	12	12	16	14	16	17
Metacromasia	13	13	16	15	16	16
Vacuolização	3	3	3	3	3	3
Halo perinuclear	16	16	13	10	14	14
G. querato-hialinos	3	9	3	3	3	3
Apag.B. Citopl.	9	9	6	6	8	6
Coilocitose	2	0	1	1	2	2
Hiperqueratose	8	1	13	10	13	11
Paraqueratose	3	1	3	1	2	2
Esp. B. Nucleares	2	2	5	5	5	4
Cariorréxis	2	2	2	1	1	1
Edema nuclear	18	14	17	17	17	17
Binucleação	10	2	15	16	15	15
Cariopicnose	12	12	12	12	10	12
Cariólise	2	5	1	2	3	1
Hipercromasia	9	9	6	8	8	8
Aumento rel.N/C	7	2	8	8	8	8
Cont. irreg. núcleo	0	0	0	1	0	0
Anisonucleose	1	0	0	0	0	0
Cariomegalia	4	3	4	4	4	4
Dist. Irreg.cromatina	4	1	2	2	2	2
Disqueratose	1	0	0	0	0	0

NOTA: Conv – convencional; G.querato-hialinos – grânulos querato-hialinos; Apag.B. Citopl.- apagamento de bordos citoplasmáticos; Esp. B. Nucleares – espessamento de bordos nucleares; Aumento rel.N/C – aumento da relação núcleo/citoplasma; Cont. irreg. Núcleo – contorno irregular do núcleo; Dist. Irreg.cromatina – distribuição irregular da cromatina n=18.

A tabela 2 representa comparações entre método convencional de Papanicolaou, Meio líquido SurePath e meio líquido EtIFP, levando em consideração a presença de alterações reativas, reparativas, degenerativas, pré-neoplásicas e neoplásicas em células de material cérvico-vaginal.

TABELA 2: PRESENÇA DE ALTERAÇÕES REATIVAS, REPARATIVAS, DEGENERATIVAS, PRÉ-NEOPLÁSICAS E NEOPLÁSICAS EM CÉLULAS DE MATERIAL CERVICOVAGINAL NO MÉTODO CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU E NO TEMPO ZERO E APÓS 3, 7 E 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO NO MEIO LÍQUIDO ETIFP

Alterações	Conv	SurePath	EtIFP tempo 0	EtIFP 3 dias	EtIFP 7 dias	EtIFP 15 dias
Pseudoeosinofilia	12	7	15	14	15	15
Metacromasia	13	7	15	15	14	16
Vacuolização	8	5	9	7	7	8
Halo perinuclear	14	15	12	13	14	15
G. querato-hialinos	4	6	5	1	1	4
Apag. B. Citopl.	6	7	5	4	6	6
Coilocitose	0	1	0	0	0	0
Hiperqueratose	8	3	13	13	11	11
Paraqueratose	3	0	5	8	4	3
Homog. Cromatina	1	0	0	0	0	0
Esp. B. Nucleares	1	2	0	1	0	1
Cariorréxis	1	0	3	1	2	1
Edema nuclear	14	14	14	15	15	15
Binucleação	9	9	15	15	14	15
Cariopcnose	11	11	10	7	8	12
Cariólise	2	3	2	1	0	2
Hipercromasia	8	9	9	7	10	10
Aumento rel. N/C	5	3	8	8	7	8
Cont. Irreg. núcleo	0	1	0	0	2	0
Cariomegalia	3	2	0	0	0	0
Dist. Irreg. cromatina	0	1	1	0	0	1

NOTA: Conv – convencional; G.querato-hialinos – grânulos querato-hialinos; Apag.B. Citopl.- apagamento de bordos citoplasmáticos; Homog. Cromatina – homogenização da cromatina; Esp. B. Nucleares – espessamento de bordos nucleares; Aumento rel.N/C – aumento da relação núcleo/citoplasma; Cont. irreg. Núcleo – contorno irregular do núcleo; Dist. Irreg.cromatina – distribuição irregular da cromatina (n=16).

Os resultados das leituras segundo o sistema de classificação Bethesda estão representados nas tabelas 3 e 4.

TABELA 3: RESULTADOS DAS LEITURAS DAS LÂMINAS DE MATERIAL CÉRICO-VAGINAL NO MÉTODO DE PAPANICOLAOU, NO MEIO LÍQUIDO COMERCIAL SUREPATH APÓS 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO E NO MEIO LÍQUIDO IFP NO TEMPO 0 E APÓS 3, 7 E 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO (N=18)

Resultado Citológico	Convencional	SurePath 15 dias	IFP tempo 0	IFP 3 dias	IFP 7 dias	IFP 15 dias
NILM	14	15	14	14	14	14
ASC-US	0	2	1	2	0	0
ASC-H	1	0	0	0	0	0
LSIL	3	1	3	2	4	4
HSIL	0	0	0	0	0	0

TABELA 4: RESULTADOS DAS LEITURAS DAS LÂMINAS DE MATERIAL CÉRVICO-VAGINAL NO MÉTODO DE PAPANICOLAOU, NO MEIO LÍQUIDO COMERCIAL SUREPATH APÓS 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO E NO MEIO LÍQUIDO ETIFP NO TEMPO 0 E APÓS 3, 7 E 15 DIAS DE CONSERVAÇÃO (N=16)

Resultado Citológico	Convencional	SurePath 15 dias	EtIFP tempo 0	EtIFP 3 dias	EtIFP 7 dias	EtIFP 15 dias
NILM	16	15	16	16	16	16
ASC-US	0	0	0	0	0	0
ASC-H	0	0	0	0	0	0
LSIL	0	1	0	0	0	0
HSIL	0	0	0	0	0	0

A Figura 20 apresenta fotomicrografias de alterações citológicas em esfregaços da mesma amostra classificados como ASC-H, NILM E LSIL, pelas metodologias convencional de papanicolaou, meio líquido SurePath após 15 dias de preservação e meio líquido IFP após 15 dias de preservação celular, respectivamente.

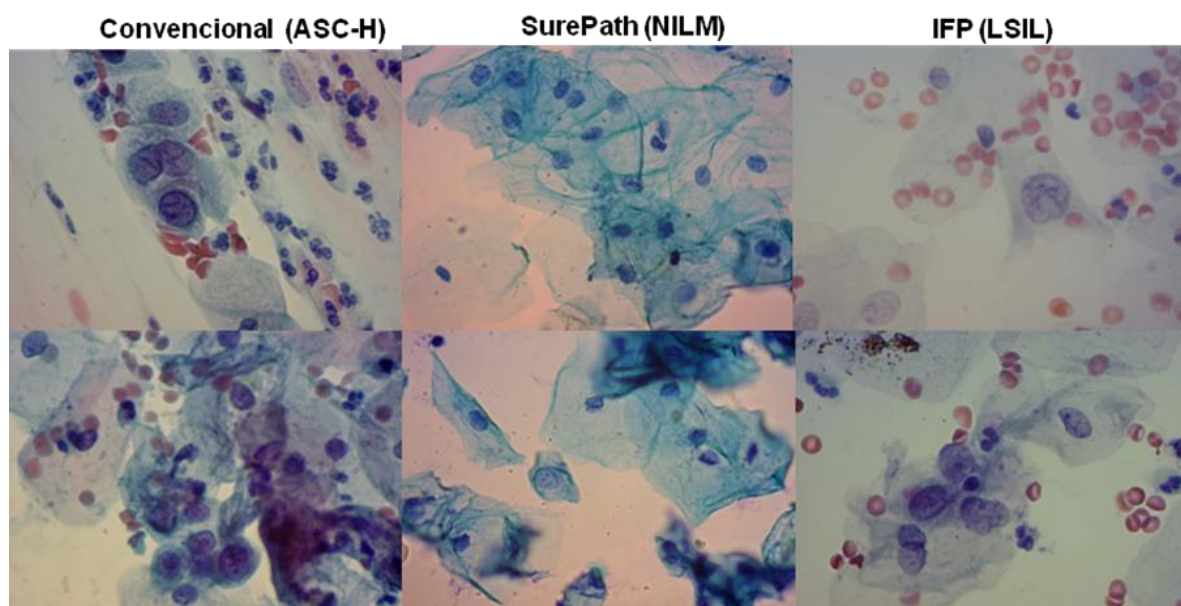


FIGURA 20 - ALTERAÇÕES CITOLÓGICAS EM ESFREGAÇOS CERVICOVAGINAIS CLASSIFICADOS COMO ASC-H, NILM E LSIL, PELAS METODOLOGIAS CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU, MEIO LÍQUIDO SUREPATH APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO E MEIO LÍQUIDO IFP APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO CELULAR, RESPECTIVAMENTE

FONTE: A autora

A figura 21 apresenta fotomicrografias de alterações citológicas em esfregaços da mesma amostra classificados como LSIL, pelas metodologias convencional de Papanicolaou, meio líquido SurePath após 15 dias de preservação e meio líquido IFP após 15 dias de preservação celular, respectivamente.



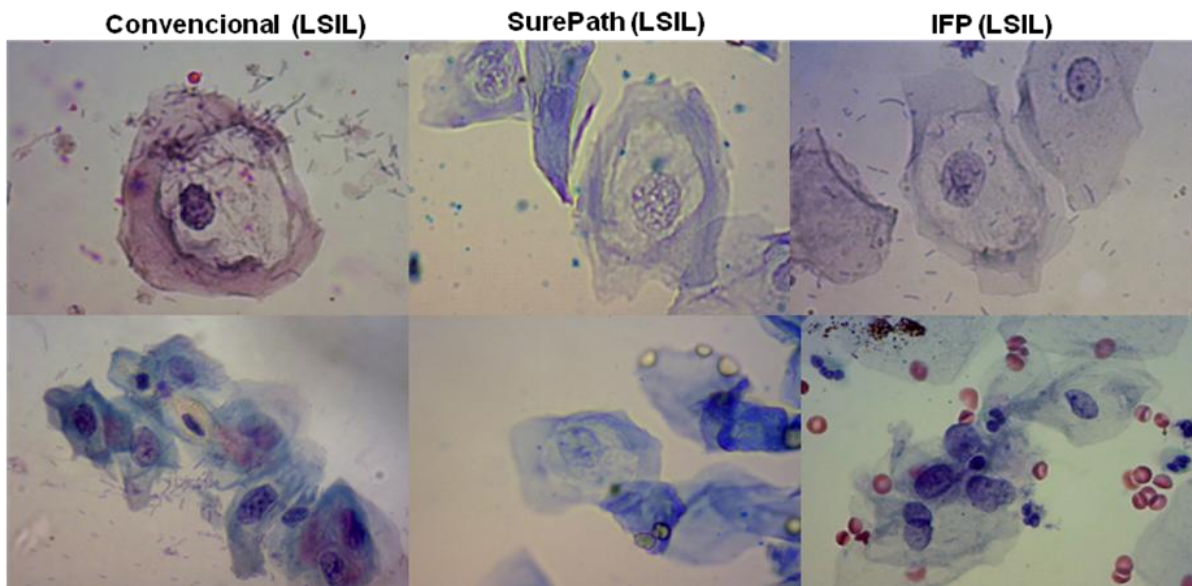


FIGURA 21 - ALTERAÇÕES CITOLÓGICAS EM ESFREGAÇOS CERVICOVAGINAIS CLASSIFICADOS COMO LSIL, PELAS METODOLOGIAS CONVENCIONAL DE PAPANICOLAOU, MEIO LÍQUIDO SUREPATH APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO E MEIO LÍQUIDO IFP APÓS 15 DIAS DE PRESERVAÇÃO CELULAR  
FONTE: A autora

## 6 DISCUSSÃO

O trabalho organizado no campo do diagnóstico precoce oferece possibilidades de resultados concretos na vida dos pacientes, tanto no aumento da possibilidade de cura quanto na qualidade de vida. Assim, estudos sobre desenvolvimento de metodologias para rastreamento de doenças são bastante interessantes para os sistemas públicos de saúde.

Em diversos estudos, tem-se descrito a técnica de citologia em meio líquido como um melhoramento da citologia convencional de Papanicolaou no que diz respeito à qualidade amostral, destacando-se a diminuição de artefatos celulares. Relata-se que, com a citologia em meio líquido, pode-se diminuir o número de amostras insatisfatórias e de resultados equivocados, bem como ressalta-se que, com o material coletado, há a possibilidade de realização de testes adicionais (HUTCHINSON *et al.*, 1999; LONGATTO FILHO *et al.*, 2005; DOYLE *et al.*, 2006; TAYLOR *et al.*, 2006; ZHU *et al.*, 2007) .

Materiais disponíveis comercialmente para citologia em meio líquido são considerados adequados também para análises moleculares e testes imuno-histoquímicos que permitem confirmar a presença de microrganismos como o HPV, bem como avaliar o desenvolvimento do carcinoma cervical. Apesar disso, a implantação da citologia em meio líquido ainda não é viável no sistema público de saúde brasileiro, devido aos altos custos para sua implantação (MACHADO *et al.*, 2008). Caetano e colaboradores (2006) avaliaram o custo-efetividade, comparando o teste convencional de Papanicolaou a novas tecnologias de rastreio de câncer de colo uterino, que incluem citologia em meio líquido e testes moleculares para detecção de HPV. Concluíram que, apesar da possibilidade do exame de Papanicolaou ser mais custo-efetivo, as mais recentes tecnologias de rastreamento do câncer de colo do útero podem vir a mostrar melhor razão de custo-efetividade na dependência dos preços praticados no setor de saúde.

Assim, existe a necessidade de desenvolvimento de novos estudos na tentativa de melhorar a técnica convencional de Papanicolaou, bem como propor alternativas para coleta e preservação de células para exames citológicos de materiais originados de diferentes tecidos. Em tais estudos, é importante considerar objetivos como, a diminuição de interferentes na análise citológica, a possibilidade

de transporte e o aumento do tempo de preservação morfológica das células, buscando a implantação de métodos acessíveis a sistemas de saúde pública, para que a cobertura possa ser ampliada no rastreamento de vários tipos de câncer.

São numerosas as substâncias orgânicas que podem ser utilizadas para fixação de material citológico. O etanol é amplamente empregado como fixador celular, geralmente utilizado na concentração de 95% em meio aquoso, para a fixação de células em lâmina no exame de Papanicolaou (TAKAHASHI, 1982). Estudos apontam para o uso de alcoóis, ácidos e aldeídos em diferentes preparações no intuito de preservar a morfologia celular (BENCROFT e STEVENS, 1990; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1991; KOSS e MELAMED, 2005; COSTA e MANSUR, 2008; CAPUTO *et al.*, 2009). Dessa forma, decidiu-se estudar os componentes citados no Quadro 2 afim de se obter uma ou mais soluções para utilização em citologia em meio líquido.

As formulações foram preliminarmente testadas em células de mucosa oral por haver maior facilidade de coleta e maior disponibilidade de doadores desse tipo de material quando se compara a coletas cervicovaginais. A análise de conservação de material citológico oral pode ser comparada à citologia cervicovaginal, uma vez que são epitélios de revestimento bastante semelhantes no que se refere ao tecido escamoso estratificado.

Na escolha da metodologia de preparo das amostras a ser utilizada, optou-se por metodologia já descrita como satisfatória por Machado e colaboradores (2008), utilizando-se centrifugação comum e secagem ao ar, por ser viável e disponível em laboratórios de Análises Clínicas.

No preparo de amostras citológicas, é fundamental que sejam preservadas algumas estruturas celulares que permitam a observação de características morfológicas determinantes para a identificação das células e de suas possíveis alterações morfológicas. Em seu estudo, Trunk e colaboradores (2004) avaliaram características morfológicas em amostras cervicovaginais displásicas, tais como cromatina grosseiramente granulada, hiperchromasia nuclear e presença de nucléolos proeminentes. Denton e colaboradores (2008) descreveram amostras positivas para lesões cervicais analisando formato nuclear e granulosidade da cromatina. Tendo em vista a importância dessas características, pode-se afirmar que estudos envolvendo preservação de material para citologia devem levar em consideração a



integridade celular e propriedades morfológicas, destacando-se características nucleares, as quais são determinantes para a distinção de anormalidades epiteliais.

As colorações do núcleo, do citoplasma e de microrganismos, bem como celularidade, sobreposição celular e presença de artefatos foram considerados neste trabalho como importantes características a serem observadas para a seleção dos meios líquidos mais adequados (Quadros 6, 7 e 8). Lucena e colaboradores (2011) consideram como esfregaços ideais aqueles que apresentam adequada celularidade, além de uniformidade de distribuição celular e número reduzido de artefatos.

A continuidade dos testes preliminares com células de mucosa cervicovaginal foi realizada com os meios líquidos 1, 29 e 55 e com novas formulações desenvolvidas, com base nos resultados obtidos nos testes preliminares de mucosa oral e em novas informações obtidas na literatura (BENCROFT e STEVENS, 1990; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1991; KOSS e MELAMED, 2005; COSTA e MANSUR, 2008; NUNES e FAGUNDES, 2008; YOSHITOME *et al.*, 2008; CAPUTO *et al.*, 2009) (Quadro 4). Com os novos testes, os melhores resultados obtidos nas análises citológicas, após 3 dias de conservação, foram com os meios 55 e 122 (Quadros 9 e 10), que passaram a ser denominados de IFP e EtIFP, respectivamente. Em amostras com os meios líquidos 117, 119, 123, 124, 125, 126 e 127, obteve-se resultados comparáveis, com os meios IFP e EtIFP, em adequabilidade e qualidade amostrais. O meio líquido 117 foi desenvolvido com base no meio IFP, substituindo-se o tampão fosfato 10 mmoles/l pH 7,4 por solução salina de NaCl 0,9 g/dl. Neste caso, como não houve modificações significativas no padrão citológico em relação ao meio IFP, optou-se por manter a seleção deste para os próximos testes. O meio líquido 119 continha 90 ml/dl de etanol em sua composição. Os resultados obtidos com tal formulação foram menos adequados em relação à presença de células arrebitadas ou deformadas que o meio líquido 122, o qual detinha composição parecida, variando somente na quantidade de etanol (20 ml/dl). Os meios 122 (EtIFP), 123 e 127 foram testados na mesma bateria, apresentando resultados satisfatórios e equivalentes. Porém, optou-se pela escolha do primeiro, por apresentar menor concentração de formaldeído em relação ao meio 123 (de 3 para 1 ml/dl) e menor concentração de isopropanol (de 20 para 1 ml/dl), quando comparado ao meio 127. Os meios 124, 125 e 126 continham metanol em sua composição. O metanol é considerado um solvente orgânico tóxico, que pode causar

neurite ótica e parkinsonismo secundário em casos de exposição ocupacional (BRASIL/MS, 2001). Diante disso e do fato de que tais formulações não apresentaram resultados superiores em termos de conservação celular quando comparadas aos demais meios líquidos escolhidos, tais meios líquidos foram excluídos do estudo.

Na análise de adequabilidade das amostras colhidas pelo método convencional de Papanicolaou; em meio líquido comercial SurePath (BD) após 15 dias de conservação celular; e em meios líquidos IFP e EtIFP, nos tempos zero e após 3, 7 e 15 dias de preservação celular (Figuras 6 a 9), de um modo geral, os resultados foram satisfatórios, observando-se padrão semelhante entre os meios IFP, EtIFP e o método convencional em relação aos dados obtidos.

O meio líquido comercial (n=20) apresentou uma amostra classificada com a classificação “muito” em relação a presença de células deformadas; o meio IFP (n=20) não apresentou amostras com tal classificação, assim como as amostras de citologia convencional (n=20). Da mesma forma, empregou-se a classificação “muito” em uma amostra meio líquido comercial (n=20) para presença de células deformadas; nenhuma amostra em meio EtIFP (n=20) e amostra convencional (n=20).

Em relação à presença de dobramentos celulares, foram classificadas como “muito” cinco amostras em meio líquido comercial, assim como em uma amostra em meio IFP após 15 dias de conservação celular. Na comparação entre citologia convencional e meios líquidos EtIFP e SurePath, observou-se nove amostras com muitas células com dobramentos apenas neste último meio líquido. Araújo (1999) relatou a sua presença, possivelmente devida à aglomeração celular em alguns esfregaços cervicovaginais. Koss e Melamed (2005), ao descrever características de células intermediárias, afirmaram que tais tipos celulares podem apresentar dobramentos citoplasmáticos. Esse fenômeno pode levar a resultados falso-positivos, pela simulação da presença de coilócitos. A presença de dobramentos celulares não determinou a insatisfatoriedade de nenhuma amostra analisada nesses experimentos.

Em relação à ocorrência de citólise, não se observou frequência relevante na maioria amostras analisadas. Na análise comparativa entre as citologias convencional, meio IFP e meio líquido comercial, foram observadas de uma a três amostras com muita citólise em IFP e uma amostra com essa característica no meio

SurePath. Comparando a citologia convencional, meio líquido EtIFP e meio líquido comercial, foram classificadas amostras com muita presença de citólise: Uma amostra pelo método de coleta convencional; duas amostras no meio líquido SurePath; e de uma a três amostras no meio EtIFP ao longo do tempo. De um modo geral, o fenômeno de citólise não interferiu nas análises citológicas. Gompel e Koss (2006) descreveram a citólise como um processo que resulta da digestão do glicogênio por lactobacilos, e que atinge particularmente células intermediárias. Os esfregaços exibem núcleos nus e detritos celulares. Assim, a citólise observada como fator limitante em algumas amostras, é provável resultado de um fenômeno fisiológico. Em algumas das amostras mantidas em IFP ou EtIFP, pode ter ocorrido citólise por envelhecimento celular.

A intensa sobreposição celular dificultou a análise em cinco preparações de amostras pelo método convencional de Papanicolaou e em três amostras em meio líquido comercial SurePath. Na preservação em meio líquido IFP, de uma a cinco amostras apresentaram intensa sobreposição celular ao longo dos quinze dias de conservação celular. Da mesma forma, em meio líquido EtIFP apresentou de duas a quatro amostras com muita sobreposição celular enquanto que uma amostra em meio líquido comercial apresentou tal inconveniente. DIAS e colaboradores (2007) compararam os desempenhos de coletas de material citológico oral por método convencional e em meio líquido comercial. Observaram que a sobreposição celular, embora reduzida, não foi eliminada pela técnica em meio líquido. O preparo de amostras citológicas, sejam elas por método convencional de Papanicolaou ou em meio líquido, é de difícil padronização, considerando-se a heterogeneidade na celularidade do material coletado, influenciada por fatores diversos, que podem fugir ao controle do técnico, tanto no momento da coleta como no processamento da amostra.

Houve baixa frequência de células arrebatadas na maioria das amostras obtidas pelas metodologias analisadas (Figuras 6 e 8). Na análise comparativa entre os métodos, houve uma amostra no meio comercial classificada como “muito”, ; assim como, entre uma e duas amostras, ao longo do tempo, em meio IFP; e, . quando se comparou os meios EtIFP, SurePath e método convencional, observou-se entre uma e 2 amostras EtIFP com muitas células arrebatadas, ao longo do tempo; em apenas uma amostra para cada um dos outros métodos. A presença de células

arrebetadas em proporções variáveis em algumas amostras pode ter sido devida a aspectos técnicos do seu preparo, a ser esclarecida.

O obscurecimento impossibilitou a análise citológica em duas amostras em meio líquido IFP, por leucócitos (Figura 6); e em quatro amostras em meio EtIFP, sendo duas amostras por leucócitos e duas, por microrganismos (Figura 8). Em ambos os casos, o obscurecimento ocorreu em todos os tempos de preservação testados. Solomon e Nayar (2005) recomendam que amostras com mais de 75% de células escamosas obscurecidas devem ser consideradas insatisfatórias.

Em uma pesquisa com o intuito de identificar os principais fatores limitantes relacionados à adequabilidade da amostra em citologia convencional de Papanicolaou e sua influência sobre a detecção das lesões precursoras do câncer do colo do útero, Amaral e colaboradores (2008), concluíram que os principais fatores que prejudicaram parcialmente a análise citológica foram: ausência de células endocervicais, esfregaços dessecados, purulentos ou com áreas espessas. A presença de fatores que obscurecem os esfregaços citológicos convencionais poderia ser explicada pelo excesso de muco e secreção no momento da coleta. Tal inconveniente poderia ser eliminado com a retirada do excesso de muco ou secreções antes do procedimento de coleta.

Em relação à qualidade amostral, a coloração do núcleo e a estrutura da cromatina foram consideradas satisfatórias na maioria das amostras, apresentando apenas uma amostra insatisfatória pela metodologia SurePath e uma, em meio líquido IFP, para os tempos zero, 3 e 7 dias de preservação celular (Figura 7). Além disso, a coloração do núcleo, a estrutura da cromatina e a coloração do citoplasma apresentaram insatisfatoriedades em 4 amostras em meio líquido EtIFP (zero e 7 dias); em 3 amostras (3 dias); e em uma amostra (15 dias) (Figura 9). As amostras que apresentaram insatisfatoriedade em coloração de estruturas celulares correspondem às obscurecidas por leucócitos ou microrganismos, o que poderia ser o motivo das inconformidades na coloração. De um modo geral, as colorações das estruturas celulares tiveram melhor desempenho nas amostras convencionais e no meio líquido IFP após 15 dias de conservação, tendo em vista que as classificações “Satisfatório ótimo” foram atribuídas a esses métodos em maior proporção. Os processos de coloração foram realizados em diferentes baterias de coloração, porém utilizando-se corantes e técnica de processamento padronizados. Apesar de se ter

mantido condições padronizadas para a coloração de lâminas, eventualmente pode haver influência de variáveis não cogitadas no processo.

A celularidade foi considerada satisfatória em todas as amostras. No entanto, houve maior proporção de amostras consideradas "Satisfatórias ótimas" nos meios IFP e EtIFP, em comparação aos métodos convencional e SurePath (Figuras 7 e 9). Na coleta convencional de Papanicolaou, parte da amostra coletada é distribuída na extensão da lâmina de citologia e parte do material permanece aderida à escova citológica. De modo diferente, o meio líquido é homogeneizado para destacar células aderidas à escova citológica, prosseguindo com a concentração de células por centrifugação e aplicação destas em uma região restrita da lâmina de microscopia. Essa condição pode explicar parcialmente o fato de haver um número maior de amostras classificadas como "Satisfatório regular" pela técnica convencional em comparação ao método de citologia em meio líquido IFP. O fato de haver maior proporção de amostras com celularidade "Satisfatório regular" pelo método SurePath pode ser explicado devido às coletas duplas realizadas com a mesma voluntária para os diferentes métodos comparados. As amostras destinadas para a metodologia comercial eram provenientes do uso de uma segunda escova cervical, a qual poderia conter menor quantidade de células quando comparada ao número de células retiradas com a primeira escova cervical. Wilbur e colaboradores (1993), Mcgoogan e Reith (1996), Hutchinson e colaboradores (1994) e Ring e colaboradores (2002), também confeccionaram esfregaços para citologia convencional e em meio líquido, utilizando o mesmo instrumento de coleta, coletando-se uma única vez o material citológico.

Na avaliação da presença dos diferentes tipos celulares da mucosa cervical, não se observou diferenças consistentes ao se comparar as metodologias convencional de Papanicolaou e em meios líquidos IFP e EtIFP. A junção escamo-colunar se manteve representada em todas as metodologias, independente do tempo de preservação, revelando adequabilidade da coleta e da conservação morfológica dos tipos celulares, bem como a distinção entre eles foi mantida, o que permitiu sua observação (Figuras 10, 11 e 13).

Na análise da presença de diferentes tipos celulares nas amostras conservadas em meio líquido comercial SurePath, em comparação com os métodos em meios líquidos IFP e EtIFP, houve diferenças em relação à presença de hemácias, presentes em quatro casos de amostras em meio líquido IFP e em outros

quatro, de amostras em meio EtIFP, porém não encontradas no meio comercial (Figura 12).

Houve similaridade entre as amostras no que se refere à detecção de microrganismos quando se comparou o método convencional aos métodos IFP e EtIFP. Na comparação entre o meio líquido comercial SurePath e os meios IFP e EtIFP, houve diferença significativa apenas nas amostras nas quais não foram observados microrganismos (Figuras 16 e 17). Na comparação entre os meios líquidos IFP e SurePath, não foram detectados microrganismos na metodologia comercial em quatro amostras. De modo semelhante, quando os métodos comparados foram os meios líquidos EtIFP e SurePath, não foram observados microrganismos em três amostras por este último método. Machado e colaboradores (2008) relataram índices satisfatórios de sensibilidade e de especificidade na detecção de microrganismos nos meios líquidos estudados (etanol 95% e formaldeído 1% em tampão fosfato 150 mmoles/l), comparados à citologia convencional. Observou-se nas amostras analisadas, maior frequência de bacilos de Döderlein (44,2%), seguido por flora mista (23,3%) e *Gardnerella vaginalis* (15%), com proporções semelhantes de flora cocóide (5,8%), flora bacilar (5,8%) e *Leptothrix* spp (4,16%), bem como casos isolados de presença de fungos consistentes morfológicamente com *Candida* spp.(2,5%) (Figuras 16 e 17). Silva e colaboradores (2013) estudaram retrospectivamente laudos citopatológicos arquivados de um laboratório de Citologia Clínica e determinaram que os microrganismos observados nos exames citológicos convencionais de Papanicolaou, de forma semelhante a este estudo, apresentaram predominância de Bacilos de Doderlein (53,8%), seguido das infecções por *Gardnerella vaginalis* (21,7%), flora cocóide (8,0%), flora bacilar (6,6%) e *Candida* spp (3,8%), sendo que em 6,1% das amostras, a microbiota não foi vista.

Buscou-se avaliar a presença de alterações celulares com o entendimento de que, dependendo da metodologia empregada para a coleta e preparo de amostras citológicas, poderia haver introdução de possíveis fatores que pudessem influenciar na ocorrência ou no mascaramento de alterações celulares.

Das alterações reativas, degenerativas e displásicas observadas nas amostras de material cervical, observou-se que as técnicas de citologia convencional e em meios líquidos IFP e EtIFP apresentaram comportamentos semelhantes. Foram observadas diferenças importantes entre o meio líquido SurePath e meio

líquido IFP em relação à: presença de grânulos querato-hialinos, em maior proporção no meio SurePath (9/18); sendo que no meio IFP observou-se maior proporção de hiperqueratose, (13/18); e de binucleação (16/18) (Tabela 1). Nas comparações entre os meios líquidos SurePath e EtIFP, observou-se diferenças em relação, com pseudoeosinofilia (15/16) e metacromasia (16/16), hiperqueratose, (13/16), aumento da relação núcleo/citoplasma (8/16), no meio EtIFP (Tabela 2). Tais alterações não foram igualmente observadas no meio líquido SurePath, provavelmente devido ao fato de que a metodologia empregada no processamento dessas amostras leva em consideração diferenças de gradientes de densidades, metodologia diferente da empregada nos meios IFP e EtIFP, que envolve centrifugação simples. Além disso, a coloração empregada no meio SurePath preconiza corantes próprios do fabricante (Anexo 2), podendo apresentar diferenças em relação a alterações atribuídas a afinidade tintorial, o que dificulta comparações entre os métodos nesse sentido.

Observou-se que, na comparação dos resultados das leituras citológicas pelos métodos convencional, SurePath e IFP (Tabela 3), resultados negativos (NILM) foram coincidentes pelas metodologias convencional e IFP. O caso classificado como ASC-H pelo método convencional, foi considerado em amostras em meio IFP no tempo zero e após 3 dias de conservação celular como ASC-US, e como LSIL, após 7 e 15 dias de preservação. Tal amostra foi classificada como NILM pela metodologia SurePath. Tais diferenças de resultados na leitura podem ter ocorrido devido a coleta dupla descrita no item 4.2.2.2.1, a qual era realizada com o intuito de se obter material celular da mesma doadora para diferentes métodos, possibilitando o estabelecimento de uma comparação entre as diferentes técnicas estudadas. A introdução de duas escovas citológicas em diferentes momentos da coleta pode ter sido responsável por diferenças de resultado, uma vez que uma lesão pode ter sido contemplada pela coleta em regiões diferentes ou até mesmo não ser contemplada por uma das diferentes escovas citológicas.

Os 3 casos classificados como LSIL pelo método convencional foram igualmente classificados no método IFP após 3, 7 e 15 dias de conservação. No tempo zero do método IFP, uma dessas amostras foi classificada como ASC-US e as demais como LSIL. Pela metodologia SurePath, duas dessas amostras foram classificadas como ASC-US e uma foi avaliada como LSIL. Considerando-se as amostras preservadas em meios líquidos IFP e EtIFP, a mesma amostra colhida era

avaliada nos tempos 0 e após 3, 7 e 15 dias de conservação. Os processamentos sucessivos das amostras IFP podem ter heterogeneidade de distribuição de células alteradas entre as amostras dos diferentes tempos analisados, com diferentes resultados para os exames citológicos. Além disso, algumas lesões menos avançadas tem um número reduzido de células alteradas, o que pode dificultar a visualização destas, principalmente em casos de coletas duplas.

Na comparação dos resultados das leituras citológicas dos métodos convencional, SurePath e EtlFP (Tabela 4), resultados negativos (NILM) foram igualmente classificados nas metodologias convencional e EtlFP. Uma amostra classificada como LSIL pela metodologia SurePath foi considerada NILM pelas demais metodologias. Neste caso também existe a possibilidade da influência da coleta dupla nos resultados incompatíveis.

Fremont-Smith e colaboradores (2004) observaram em seu estudo um aumento significativo na taxa de detecção de lesões pré-cancerosas de alto e baixo graus, bem como um decréscimo no número de amostras insatisfatórias com utilização de meio líquido, em comparação com a metodologia convencional. Da mesma forma, Beermann e colaboradores (2009) observaram menor número de amostras insatisfatórias e aumento da sensibilidade na detecção de anormalidades citológicas em amostras de citologia em meio líquido quando comparadas com amostras de citologia convencional. Por outro lado, em alguns outros estudos, os autores não encontraram diferença significativa entre resultados citológicos quando compararam os métodos convencional e em meio líquido (OBWEGESER *et al.*, 2001; DAVEY *et al.*, 2006; RONCO *et al.*, 2007; SIGURDSSON 2012).

A citologia em meio líquido apresenta a vantagem de se poder manter as amostras por maior tempo preservadas, o que permite a preparação de novas lâminas para análise em casos de dúvidas. Entretanto, uma desvantagem do método diz respeito ao fato de que células com alterações displásicas e ou neoplásicas são homogeneamente distribuídas no esfregaço, aparecendo muitas vezes isoladas e distantes umas das outras, enquanto em amostras de citologia convencional, tais células em geral aparecem concentradas em regiões da lâmina, em grupamentos, o que facilita ao observador a confirmação de positividade da amostra.

Na comparação entre os resultados obtidos com os métodos tradicionais, ou seja, citologia convencional e citologia em meio líquido comercial SurePath, com os meios líquidos estudados neste trabalho, IFP e EtlFP, observou-se que, de um modo



geral, houve similaridade, tanto em relação à qualidade e adequabilidade das amostras, quanto em relação à observação de tipos celulares, microrganismos e seus efeitos citopáticos, bem como de alterações celulares, fossem elas reativas, degenerativas ou displásicas. No entanto, em algumas amostras, observou-se inconformidades que incluíram obscurecimento por leucócitos ou por bactérias, provavelmente relacionadas às fases de centrifugação e colocação das amostras em lâminas de microscopia.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se sugerir que os meios líquidos IFP e EtIFP são adequados para o preparo de amostras citológicas colhidas recentemente ou após preservação por até 15 dias, tanto de material obtido de mucosa oral quanto de mucosa cervicovaginal.

Nos estudos realizados, ao se comparar o desempenho dos meios IFP e EtIFP, não se observou diferenças relevantes entre ambos no que se refere a qualidade e adequabilidade das amostras, ou mesmo na observação de tipos ou alterações celulares e de microrganismos.

Quanto às inconformidades de algumas amostras estudadas neste trabalho, deve-se continuar a estudar o aperfeiçoamento da preparação de amostras citológicas a partir da preservação em meio líquido para, desta forma, se conseguir padronizar técnicas de obtenção de amostras citológicas adequadas, com a presença de microrganismos e de leucócitos em proporções devidas, ou seja, que não se tornem fatores de obscurecimento.

A partir das constatações feitas acima, pode-se sugerir a continuidade dos estudos com os meios IFP e EtIFP, bem como com outras formulações, buscando-se aprimorar a metodologia e estabelecer a sua eficácia na preservação de amostras citológicas, tanto dos tecidos estudados como de células de outras origens, buscando estudar maior número de amostras no sentido de confirmar as hipóteses levantadas.

## 7. CONCLUSÕES

A partir do estudo realizado sobre a adequabilidade de meios líquidos alternativos para a coleta, transporte e preservação de amostras para exames citológicos, pode-se concluir que:

- 7.1 Após testes preliminares com 127 diferentes composições de meios líquidos no preparo de amostras citológicas de mucosa oral e cervicovaginal, os meios IFP, composto por formaldeído 1 ml/dl, isopropanol 1 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L pH 7,4; e EtIFP, composto por etanol 20 ml/dl; formaldeído 1 ml/dl, isopropanol 1 ml/dl e tampão fosfato 10 mmol/L, se mostraram promissores para aprofundar estudos sobre a preservação de células;
- 7.2 Ao se comparar amostras de células de mucosa cervicovaginal recentes e preservadas durante 3, 7 e 15 dias no meios IFP e EtIFP com amostras de citologia convencional e amostras preservadas durante 15 dias em meio líquido comercial SurePath, observou-se similaridade em relação a: a) qualidade e adequabilidade das amostras; b) presença de tipos celulares, microrganismos e seus efeitos citopáticos; c) presença de alterações celulares reativas, degenerativas e displásicas;
- 7.3 Pode-se sugerir que os meios líquidos IFP e EtIFP são adequados para o preparo de amostras citológicas para a preservação de células por até 15 dias, tanto de material obtido de mucosa oral quanto de mucosa cervicovaginal, sem diferenças relevantes entre ambos nos itens analisados;

A partir das constatações feitas, pode-se sugerir a continuidade dos estudos com os meios IFP e EtIFP, bem como com outras formulações, buscando-se aprimorar a metodologia e estabelecer a sua eficácia na preservação de amostras citológicas.

## 8 REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, K. M.; FRIAS, P. G.; ANDRADE, C. L. T.; AQUINO, E. M. L.; MENEZES, G.; SZWARCOWALD, C. L. COBERTURA DO TESTE DE PAPANICOLAOU E FATORES ASSOCIADOS À NÃO-REALIZAÇÃO: UM OLHAR SOBRE O PROGRAMA DE PREVENÇÃO DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO EM PERNAMBUCO, BRASIL. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.5, p. 5301-5309, 2009.
- AMARAL, R. G.; MANRIQUE, E. J. C.; GUIMARÃES, J. V. R.; SOUSA, P. J.; MIGNOLLI, J. R. Q.; XAVIER, A. F.; OLIVEIRA, A. INFLUÊNCIA DA ADEQUABILIDADE DA AMOSTRA SOBRE A DETECÇÃO DAS LESÕES PRECURSORAS DO CÂNCER CERVICAL. **Revista Brasileira Ginecologia e Obstetrícia**, v. 30, p. 556-560, 2008
- ARAUJO, S. R. CITOLOGIA E HISTOPATOLOGIA BÁSICAS DO COLO UTERINO PARA GINECOLOGISTAS: "UMA SESSÃO DE SLIDES". Editora VP, Curitiba, 1999.
- BAGARELLI L. B.; OLIANI, A. H. TIPAGEM E ESTADO FÍSICO DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO POR HIBRIDIZAÇÃO IN SITU EM LESÕES INTRA-EPITELIAIS DO COLO UTERINO. v. 26, p. 59-64, 2004.
- BEERMAN, H.; DORST, E. B. L.; KUENEN-BOUMEESTER, V.; HOGENDOORN, P. C. W. SUPERIOR PERFORMANCE OF LIQUID-BASED VERSUS CONVENTIONAL CYTOLOGY IN A POPULATION-BASED CERVICAL CANCER SCREENING PROGRAM. **Gynecologic Oncology**, v. 112, p. 572–576, 2009.
- BENCROFT, J.D.; STEVENS, E. THEORY AND PRACTICE OF HISTOLOGICAL TECHNIQUES, Churchill Livingstone, 1990.
- BIBBO, M. COMPREHENSIVE CYTOPATHOLOGY, 2.ed.WB Saunders Company, 1997.
- BORSATTO, A. Z.; VIDAL, M. L. B.; ROCHA, R. C. N. P. VACINA CONTRA O HPV E A PREVENÇÃO DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO: SUBSÍDIOS PARA A PRÁTICA. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 57, p. 67-74, 2011.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE/BRASIL. DOENÇAS RELACIONADAS AO TRABALHO. MANUAL DE PROCEDIMENTOS PARA OS SERVIÇOS DE SAÚDE. Brasília, DF, 2001.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). NOMENCLATURA BRASILEIRA PARA LAUDOS CITOPATOLÓGICOS CERVICAIS. 3ª edição, Rio de Janeiro, 2012.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. NOMENCLATURA BRASILEIRA PARA LAUDOS CERVICAIS E CONDUTAS PRECONIZADAS RECOMENDAÇÕES PARA PROFISSIONAIS DE SAÚDE. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 28, p. 486-504, 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO AS SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Disponível em: <[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes\\_programas/site/home/nobrasil/programa\\_nacional\\_controle\\_cancer\\_colo\\_uterio](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_nacional_controle_cancer_colo_uterio)> Acesso em: 08 de janeiro de 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO AS SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa 2014. Incidência de Câncer no Brasil, Rio de janeiro, 2014.

BRENER, S.; JEUNON, F. A.; BARBOSA, A. A.; GRANDINETTI, H. A. M. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS BUCAL: UMA REVISÃO DE LITERATURA ENTRE O PERFIL DO PACIENTE, ESTADIAMENTO CLÍNICO E TRATAMENTO PROPOSTO. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, p. 63-69, 2007.

BRENNNA, S. M. F.; HARDY, E.; ZEFERINO, L. C.; NAMURA, I. CONHECIMENTO, ATITUDE E PRÁTICA DO EXAME DE PAPANICOLAOU EM MULHERES COM CÂNCER DE COLO UTERINO. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, p.909-914, 2001.

CAETANO, R.; VIANNA, L. M. M.; THULER, L. C. S.; GIRIANELLI, V.R. CUSTO-EFETIVIDADE NO DIAGNÓSTICO PRECOCE DO CÂNCER DE COLO UTERINO NO BRASIL. **Revista de Saúde Coletiva do Rio de Janeiro**, v. 16, p.99-118, 2006.

CAPUTO, L. F. G.; MOTA, E. M.; GITIRANA, L. B.; TÉCNICAS CITOLÓGICAS. Conceitos e Métodos Para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde, 2009.

CARRET, M. L. V.; FASSA, A. G.; SILVEIRA, D. S.; BERTOLD, A. D.; HELLAL, P. C. SINTOMAS DE DOENÇAS SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS EM ADULTOS: PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, p. 76-84, 2004.

CASTRO, T. M. P. G.; SCALA, K. A.; SCALA, W. A. MANIFESTAÇÕES ORAIS ASSOCIADAS AO PAPILOMA VIRUS HUMANO (HPV) CONCEITOS ATUAIS: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 70, p. 546-550, 2004.

CAVALCANTE, V. L. N.; MIRANDA, A.T.; PORTUGAL, G. M. P. RASTREAMENTO DECANDIDOSEVAGINAL DURANTE A PREVENÇÃO DO CÂNCER CÉRVICO-UTERINO. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 17, p. 44-48, 2005.

CAVALCANTI, S. M. B. e CARESTIATO, F. N. INFECÇÕES CAUSADAS PELOS PAPILOMAVÍRUS HUMANOS: ATUALIZAÇÃO SOBRE ASPECTOS VIROLÓGICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E DIAGNÓSTICOS. DST, **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**. v. 18, p. 73-79, 2006.

CIBAS, E.S.; DUCATMAN, B. S. CYTOLOGY: DIAGNOSTIC PRINCIPLES AND CLINICAL CORRELATES. W.B.Saunders Company, 1996.

COLLINS, G. R.; THOMAS, J.; JOSHI, N.; ZHANG, S. THE DIAGNOSTIC VALUE OF CELL BLOCK AS AN ADJUNCT TO LIQUID-BASED CYTOLOGY OF BRONCHIAL WASHING SPECIMENS IN THE DIAGNOSIS AND SUBCLASSIFICATION OF PULMONARY NEOPLASMS. *Cancer Cytopathology*, p. 135-141, 2012.

CONSOLARO, M. E. L.; ENGLER, S. S. M. CITOLOGIA CLÍNICA CERVICOVAGINAL – TEXTO E ATLAS. Editora Roca, 2012.

COSTA, J. E. S.; MANSUR, H. S. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BLENDS DE QUITOSANA/POLI (ÁLCOOL VINÍLICO) RETICULADAS QUIMICAMENTE COM GLUTARALDEÍDO PARA APLICAÇÃO EM ENGENHARIA DE TECIDO. *Química Nova*, v. 31, p. 1460-1466, 2008.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. PATHOLOGIC BASIS OF DISEASE. 5.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994.

CRUZ, L. M. B.; LOUREIRO, R. P. A COMUNICAÇÃO NA ABORDAGEM PREVENTIVA DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO: IMPORTÂNCIA DAS INFLUÊNCIAS HISTÓRICO-CULTURAIS E DA SEXUALIDADE FEMININA NA ADESÃO ÀS CAMPANHAS. **Revista Saúde e Sociedade**. São Paulo, v. 17, p. 120-131, 2008.

DAVEY, E.; BARRAT, A.; IRWIG, L.; CHAN, S. F.; MACASKILL, P.; MANNES, P.; SAVILLE, A. M. EFFECT OF STUDY DESIGN AND QUALITY ON UNSATISFACTORY RATES, CYTOLOGY CLASSIFICATIONS, AND ACCURACY IN LIQUID-BASED VERSUS CONVENTIONAL CERVICAL CYTOLOGY: A SYSTEMATIC REVIEW. *Lancet*, v. 367, p. 122–132, 2006.

DENTON, K. J.; HERBERT, A.; TURNBULL, L. S.; WADDELL, C.; DESAI, M. S.; RANA, D. N.; DUDDING, N.; SMITH, J. H. F. THE REVISED BSCC TERMINOLOGY FOR ABNORMAL CERVICAL CYTOLOGY. **Cytopathology**, v.19, p.137–157, 2008

DERCHAIN, S. F. M.; FILHO, A. L.; SYRJANEN, K. J. NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL CERVICAL: DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.27, p. 425-433, 2005.

DIAS, E. P.; MILAGRES, A.; SANTOS, J. B.; VALLADARES, C. P.; SOUZA, A. C. B.; PINHEIRO, R. S. ESTUDO COMPARATIVO DE RASPADOS ORAIS SUBMETIDOS À TÉCNICA DE CITOLOGIA EM MEIO LÍQUIDO E CITOPATOLOGIA CONVENCIONAL. **Jornal Brasileiro de Patologia Médico-Laboratorial**, v. 44, p. 25-29, 2008.

DIMAS, L. F.; PUCCIONI-SOHLER, M. EXAME DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO: INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA, TEMPO E PREPARO DA AMOSTRA NA ESTABILIDADE ANALÍTICA. **Jornal Brasileiro de Patologia Médico-Laboratorial**, v. 44, p. 97-106, 2008

DOYLE, B.; O'FARRELL, C.; MAHONEY, E.; TURNER, L.; MAGEE, D.; GIBBONS, D. LIQUID-BASED CYTOLOGY IMPROVES PRODUCTIVITY IN CERVICAL CYTOLOGY SCREENING. **Cytopathology**, v. 17, p. 60-64, 2006.

EDRIS, A. M. M.; AHMED, H. G.; MOHAMMED, E. A. ACCURACY OF ORAL EXFOLIATIVE CYTOLOGY IN SUDANESE PATIENTS UNDERGOING ORAL BIOPSY. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, v. 8, p.255-260, 2011.

FERNANDES, F.; FURTADO, Y.; RUSSOMANO, F.; SILVA, K. S.; SILVEIRA, R.; FARIA, P.; MOREIRA, P. DIAGNÓSTICO CITOPATOLÓGICO DE ASC-US E ASC-H NO SERVIÇO INTEGRADO TECNOLÓGICO EM CITOLOGIA DO INCA. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, p. 453-459, 2012.

FERNANDES, J. V.; RODRIGUES, S. H. R.; COSTA, Y. G. A. S.; SILVA, L. C. M.; BRITO, A.L.M.; AZEVEDO, J. W. V.; NASCIMENTO, E. D.; FERNANDES, T. A. A. M. CONHECIMENTOS, ATITUDES E PRÁTICA DO EXAME DE PAPANICOLAOU POR MULHERES, NORDESTE DO BRASIL. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, p. 851-858, 2009.

FERRARO, C. T. L.; CANEDO, N. H. S.; OLIVEIRA, S. P.; CARVALHO, M. G. C.; DIAS, E. P. INFECÇÃO ORAL PELO HPV E LESÕES EPITELIAIS PROLIFERATIVAS ASSOCIADAS, **Jornal Brasileiro de Patologia Médico Laboratorial**, v. 47, p. 451-459, 2011.

FERREIRA, M. L. S. M. MOTIVOS QUE INFLUENCIAM A NÃO-REALIZAÇÃO DO EXAME DE PAPANICOLAOU SEGUNDO A PERCEPÇÃO DE MULHERES **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem**, v. 13, p. 378-384, 2009.

FREMONT-SMITH, M.; MARINO, J.; GRIFFIN, B.; SPENCER, L.; BOLICK, D. COMPARISON OF THE SUREPATH™ LIQUID-BASED PAPANICOLAOU SMEAR WITH THE CONVENTIONAL PAPANICOLAOU SMEAR IN A MULTISITE DIRECT-TO-VIAL STUDY. **Cancer Cytopathology**, v. 102, p. 269-279, 2004.

GOMPEL, C. KOSS, L. G. CITOLOGIA GINECOLÓGICA E SUAS BASES ANATÔMICAS. 3ª ed. São Paulo: Manole, 2006

HUTCHINSON, M. L.; ZAHNISER, D. J.; SHERMAN, M. E.; HERRERO, R.; ALFARO, M.; BRATTI, M. C.; HILDESHEIM, A.; LORINCZ, A. T.; GREENBERG, M. D.; MORALES, J.; SCHIFFMAN, M. UTILITY OF LIQUID-BASED CYTOLOGY FOR CERVICAL CARCINOMA SCREENING. *American Cancer Society*, v. 87, p. 48-55, 1999.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Disponível em: < <http://globocan.iarc.fr/>> Acesso em 07 de fevereiro de 2014

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1991.

KARNON, J.; PETERS, J.; PLATT, J.; CHILCOTT, J.; MCGOOGAN, E.; BREWNER, N. LIQUID-BASED CYTOLOGY IN CERVICAL SCREENING: AN UPDATED RAPID

AND SYSTEMATIC REVIEW AND ECONOMIC ANALYSIS. **Health Technology Assessment**, v. 8, 2004.

KOSS. L. G.; MELAMED, M. R. DIAGNOSTIC CYTOLOGY AND IT'S HISTOPATHOLOGIC BASES. **Philadelphia: J.B. Lippincott Company**, 5ed, v. 1, 2005.

KOSS, L. G.; GOMPEL, C. INTRODUÇÃO À CITOPATOLOGIA GINECOLÓGICA COM CORRELAÇÕES HISTOLÓGICAS E CLÍNICAS. Editora Roca, 2006.

KUMAR, V.; ABBAS. K.A; FAUSTO, N. Robbins e Cotran: Patologia: Bases Patológicas das Doenças. Editora Elsevier, 7ªed, 2005.

LAUCIRICA, R.; BENTZ, J. S.; SOUERS, R.; WASSERMAN, P. G.; CROTHERS, B. A.; CLAYTON, A.; HENRY, M. R.; CHMARA, B.A.; CLARY, K. M.; FRAIG, M. M.; MORIARTY, A. T. DO LIQUID-BASED PREPARATIONS OF URINARY CYTOLOGY PERFORM DIFFERENTLY THAN CLASSICALLY PREPARED CASES? OBSERVATIONS FROM THE COLLEGE OF AMERICAN PATHOLOGISTS INTERLABORATORY COMPARISON PROGRAM IN NONGYNECOLOGIC CYTOLOGY. *Arch Pathol Lab Med*, v. 134, p. 19-22, 2010.

LEVI, A. W.; HARIGOPAL, M.; HUI, P.; SCHOFIELD, K. COMPARISON OF AFFIRM VPIII AND PAPANICOLAOU TESTS IN THE DETECTION OF INFECTIOUS VAGINITIS. **American Society for Clinical Pathology**, v 135, p.442-447, 2011.

LIMA, A. A. S.; FRANÇA, B. H. S.; IGNÁCIO, S. A.; BAIONI, C. S. CONHECIMENTO DE ALUNOS UNIVERSITÁRIOS SOBRE CÂNCER BUCAL, **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, p. 283-288, 2005.

LONGATTO FILHO, A. ; NAMİYAMA, G.; CASTELO FILHO, A.; VIANA, M. R.; DORES, G. B. SISTEMADNA-CITOLIQU(DCS): UMNOVOSISTEMA PARA CITOLOGIA EMBASELÍQUIDA– ASPECTOSTÉCNICOS. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 17, p. 56-61, 2005.

LUCENA, E. E. S.; MIRANDA, A. M.; ARAUJO, F. A. C.; GALVÃO, C. A. B.; MEDEIROS, A. M. C. MÉTODO DE COLETA E A QUALIDADE DO ESFREGAÇO DE MUCOSA ORAL. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial**, v. 11, p. 55-62, 2011.

MACHADO, J. P; NASCIMENTO, A. J.; LEONART, M. S.S. CITOLOGIA EM MEIO LÍQUIDO PARA EXAME DE CITOLOGIA CÉRVICO-VAGINAL. ESTUDO COMPARATIVO SOBRE A ATIVIDADE FIXADORA DE ETANOL E DEFORMALDEÍDO. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, v. 67, p.148-155, 2008

MACIEL, G. P.; TASCA, T.; CARLI, G. A.; ASPECTOS CLÍNICOS, PATOGÊNESE E DIAGNÓSTICO DE TRICHOMONAS VAGINALIS. **Jornal Brasileiro de Patologia Médico-Laboratorial**. v. 40, p, 152-160, 2004.

MCGOOGAN, E.; COLGAN, J.T.; RAMZY, I. CELL PREPARATION AND CRITERIA FOR SAMPLE ADEQUACY. **Acta Cytologica**. v 42, p. 25-32, 1998.

MEIRA, K. C.; GAMA, S. G. N.; SILVA, C. M. F. P. PERFIL DE MORTALIDADE POR CÂNCER DO COLO DO ÚTERO NO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO NO PERÍODO 1999-2006. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 57, p.7-14, 2010.

MEISELS, A; MORIN, C. CYTOPATHOLOGY OF THE UTERUS. 2.ed. Chicago: ASCP, 1997.

MENDÉZ M. T.; IZQUIERDO, A. F. DETECCIÓN DE VIRUS PAPILOMA HUMANO (HPV) A PARTIR DE MUESTRAS CELULARES DE CUELLO UTERINO EM BASE LÍQUIDA. CORRELACIÓN COM LA INMUNORREACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA P16INK4A. **Investigación Clínica**, v. 52, p. 3 - 14, 2011.

MIRANDA, D. G. N.; JAMNIK, S.; SANTORO, S. J.; UEHARA, C. AVALIAÇÃO DO ESCARRO INDUZIDO NO DIAGNÓSTICO DO CARCINOMA BRÔNQUICO **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 49, p. 91-98, 2003.

MONSONEGO, A. A.; BERGERON, C.; DACHEZ, R.; LIARAS, J.; SAUREL, J.; ZERAT, L.; CHATELAIN, P.; MOTTOT, C. LIQUID-BASED CYTOLOGY FOR PRIMARY CERVICAL CANCER. **British Journal of Cancer**, v. 84, p. 360–366, 2001.

MOORE, E. E.; WARK, J. D.; HOPPER, J. L.; ERBAS, B.; GARLAND, S. M. THE ROLES OF GENETIC AND ENVIRONMENTAL FACTORS ON RISK OF CERVICAL CANCER: A REVIEW OF CLASSICAL TWIN STUDIES. **Twin Research And Human Genetics**, v. 15, p. 79–86, 2012.

NCI BETHESDA SYSTEM WEBSITE ATLAS. Disponível em: < <http://nih.techriver.net/>> Acesso em 05 de dezembro de 2013.

NARAYAN, G.; MURTY, V.V. INTEGRATIVE GENOMIC APPROACHES IN CERVICAL CANCER: IMPLICATIONS FOR MOLECULAR PATHOGENESIS, **Future Oncol**. v. 6, p. 1643-1652, 2011.

NAYLOR, B. THE CENTURY FOR CYTOPATHOLOGY. **Acta Cytologica**, v. 44, p. 709-725, 2000.

NEVILLE, B. W.; DAY, T. A. ORAL CANCER AND PRECANCEROUS LESIONS, **Cancer Journal Clinic**, v. 52, p. 195-215, 2002.

NUNES, R. R. A.; FAGUNDES, V. CARIÓTIPOS DE OITO ESPÉCIES DE ANFÍBIOS DAS SUBFAMÍLIAS HYLINEAE E PHYLLOMEDUSINAE (ANURA, HYLIDAE) DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**, v. 23, p. 21-36, 2008

OBWEGESER, J. H.; BRACK, S. DOES LIQUID-BASED TECHNOLOGY REALLY IMPROVE DETECTION OF CERVICAL NEOPLASIA? A PROSPECTIVE, RANDOMIZED TRIAL COMPARING THE THINPREP PAP TEST WITH THE CONVENTIONAL PAP TEST, INCLUDING FOLLOW-UP OF HSIL CASES. **Acta Cytologica**, v. 45, p. 709-714, 2001



OLIVEIRA, P. M.; MASCARENHAS, R. E.; FERRER, S. R.; OLIVEIRA, R. P. C.; TRAVESSA, I. E. M.; GOMES, M. V. C.; GRASSI, M. F. R. VULVOVAGINITES EM MULHERES INFECTADAS PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 30, p. 121-126, 2008.

RING, M. ET AL., EVALUTION OF LIQUID-BASED CYTOLOGY IN CERVICAL SCREENING OF HIGH-RISK POPULATIONS: A SPLIT STUDY OF COLPOSCOPY AND GENITO-URINARY MEDICINE POPULATIONS. **Cytopathology**, p. 152-159, 2002.

RODRIGUES, L. M.; MARTINIANO, C. S.; CHAVES, A. E. P.; AZEVEDO, E. B.; UCHOA, S. A. C. ABORDAGEM ÀS DOENÇAS SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS EM UNIDADES BÁSICAS DE SAÚDE DA FAMÍLIA. **Cogitare Enfermagem**, v. 16, p. 63-69, 2011.

RONCO, G.; SEGNA, N.; GIORGI-ROSSI, P.; ZAPPA, M.; CASADEI, G. P.; CAROZZI, F.; PALMA, P. D.; MISTRO, A.; FOLICALDI, S.; GILLIO-TOS, A.; NARDO, C.; NALDONI, C.; SCHINCAGLIA, P.; ZORZI, P.; CONFORTINI, M.; CUZICK, J. HUMAN PAPILLOMAVIRUS TESTING AND LIQUID-BASED CYTOLOGY: RESULTS AT RECRUITMENT FROM THE NEW TECHNOLOGIES FOR CERVICAL CANCER RANDOMIZED CONTROLLED TRIAL. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 98, p.765-774, 2006.

ROSA, M. I.; MEDEIROS, L. R.; ROSA, D. D.; BOZETTI, M. C.; SILVA, F. R.; SILVA, B. R. PAPILOMAVÍRUS HUMANO E NEOPLASIA CERVICAL. **Cadernos de Saúde Pública Rio de Janeiro**, v. 25, p. 953-964, 2009.

SHEIDT, M. B.; RICHTER, E. G.; SILVA, J.C.; SHEIDT, B.; POLETTO, F. IMPACTO DO SERVIÇO DE PATOLOGIA NA PREVALÊNCIA DO CÂNCER DE COLO UTERINO EM SAÚDE PÚBLICA. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 39, p. 30-36, 2010.

SIEBERS, A. G.; KLINKHAMER, P. J. J. M.; VEDDER, J. E. M. ARBYN, M.; BULTEN, J. CAUSES AND RELEVANCE OF UNSATISFACTORY AND SATISFACTORY BUT LIMITED SMEARS OF LIQUID-BASED COMPARED WITH CONVENTIONAL CERVICAL CYTOLOGY. *Arch Pathol Lab Med*, v. 136, p.76-83 , 2012.

SIGURDSSON, K. IS A LIQUID-BASED CYTOLOGY MORE SENSITIVE THAN A CONVENTIONAL PAP SMEAR? **Cytopathology**, v.24, p.254–263, 2013

SILVA, M. G. P.; ALMEIDA, R. T. A.; BASTOS, E. A.; NOBRE, F. F. DETERMINANTES DA DETECÇÃO DE ATÍPIAS CELULARES NO PROGRAMA DE RASTREAMENTO DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO NO RIO DE JANEIRO, BRASIL. **Revista Panamericana Salud Publica**, v. 34, p. 107-113, 2013

SOLOMON, D.; NAYAR, R. SISTEMA BETHESDA PARA CITOPATOLOGIA CERVICOVAGINAL. 2ª edição, Rio de Janeiro, Editora Revinter, 2005.

SOUZA, L. R. B.; FERRAZ, K. D.; PEREIRA, N. S.; MARTINS, M. V. CONHECIMENTO ACERCA DO CÂNCER BUCAL E ATITUDES FRENTE À SUA ETIOLOGIA E PREVENÇÃO EM UM GRUPO DE HORTICULTORES DE TERESINA (PI). **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, p. 31-39, 2012.

TAMAYO, R. P. INTRODUCCIÓN A LA PATOLOGIA: MECANISMOS DE ENFERMEDAD, Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 3.ed., 1987.

TAKAHASHI, M. ATLAS COLORIDO DE CITOLOGIA DO CÂNCER. 2.ed. São Paulo: Editora Manole, 1982.

TAYLOR, S.; KUHN, L.; DUPREE, W.; DENNY, L.; SOUZA, M.; WRIGHT, T. DIRECT COMPARISON OF LIQUID-BASED AND CONVENTIONAL CYTOLOGY IN A SOUTH AFRICAN SCREENING TRIAL. *International Journal of Cancer*, v. 118, p. 957-962, 2006.

TRUNK, M. J.; DALLENBACH-HELLWEG, G.; RIDDER, R.; PETRY, K. U.; KENBERG, H.; SCHNEIDER, V.; KNEBEL, D. M. MORPHOLOGIC CHARACTERISTICS OF P16 POSITIVE CELLS IN CERVICAL. **Acta Cytologica**, v. 48, 2004.

VALE, D. B. A. P.; MORAIS, S. S.; PIMENTA, A. L.; ZEFERINO, L. C. AVALIAÇÃO DO RASTREAMENTO DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO NA ESTRATÉGIA SAÚDE DA FAMÍLIA NO MUNICÍPIO DE AMPARO, SÃO PAULO, BRASIL. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 26, p. 383-390, 2010.

VIDAL, A. K. L.; CALDAS JUNIOR, A. F.; MELLO, R. J. V.; BRANDÃO, V. R. A.; LIMA, P. A.; FIGUEIROA, J. N. CITOLOGIA ESFOLIATIVA CONVENCIONAL VERSUS CITOLOGIA EM MEIO LÍQUIDO PARA PREVENÇÃO E DIAGNÓSTICO PRECOCE DO CARCINOMA ESCAMO CELULAR (CEC) ORAL. **Odontologia Clínico-Científica**, Recife, v. 10, p. 31-36, 2011.

WHITHLOCK, E. P.; VESCO, K. K.; EDER, M.; LIN, J. S.; SENER, C. A.; BURDA, B. U. LIQUID-BASED CYTOLOGY AND HUMAN PAPILLOMAVIRUS TESTING TO SCREEN FOR CERVICAL CANCER: A SYSTEMATIC REVIEW FOR THE U.S. PREVENTIVE SERVICES TASK FORCE. **Annals of Internal Medicine**, v. 155, p. 687-697, 2011.

WILBUR, D.C. CLINICAL TRIALS DEMONSTRATE AN INCREASED DETECTION RATE OF ABNORMAL CERVICAL CYTOLOGIC SPECIMENS. **American Journal of Clinical Pathology**. p. 209-214. 1993.

YOSHITOME, M. Y.; SOUZA, M. F. P.; KARSBURG, E. V.; CARACTERIZAÇÃO DOS CROMOSSOMOS MITÓTICOS E ÍNDICE MEIÓTICO DE THEOBROMA SPECIOSUM(L.) WILLD. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, v. 6, p. 21-28, 2008.

ZHAO, F.H.; HU, S.Y.; BIAN, J.J.; LIU, B.; PECK, R. P.; BAO, Y. P.; PAN, Q.J.; FRAPPART, L.; SELLORS, J.; QIAO, Y.L. COMPARISON OF THINPREP AND SUREPATH LIQUID-BASED CYTOLOGY AND SUBSEQUENT HUMAN

PAPILLOMAVIRUS DNA TESTING IN CHINA. **Cancer Cytopathology**, v. 119, p.387-94, 2011.

ZHU, J.; NORMAN, I.; ELFGREN, K.; GABERI, V.; HAGMAR, B.; HJERPE, A.; ANDERSSON, S. A COMPARISON OF LIQUID-BASED CYTOLOGY AND PAP SMEAR AS A SCREENING METHOD FOR CERVICAL CANCER. **Oncology Reports**, v. 18, p. 157-160, 2007.

ZONTA, M. A.; MONTEIRO, J.; SANTOS JUNIOR, G.; PIGNATARI, A. C. C.; ORAL INFECTION BY THE HUMAN PAPILLOMA VIRUS IN WOMEN WITH CERVICAL LESIONS AT A PRISON IN SÃO PAULO, BRAZIL, **Jornal Brasileiro de Otorrinolaringologia**, v. 78, p. 66-72, 2012.

**ANEXOS**

## ANEXO 1

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Michelli Aparecida Bertolazo da Silva, Profa. Maria Suely Soares Leonart e Prof. Sandro Germano, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando você, maior de 18 anos, a participar de um estudo intitulado “DESENVOLVIMENTO DE MEIO LÍQUIDO PARA AMOSTRAS DE EXAMES CITOLÓGICOS”, que vai pesquisar a ação de um líquido conservante para melhorar a qualidade de exames envolvendo células humanas. É através de pesquisas como esta que ocorrem os avanços na medicina e sua participação é de fundamental importância.

a) O objetivo desta pesquisa é estudar o efeito conservante de um líquido desenvolvido em laboratório para melhorar a qualidade de exames envolvendo células.

b) Caso você concorde em participar da pesquisa, seus dados pessoais biométricos (como idade, peso, altura, histórico clínico) serão coletados. Além disso, será necessário coletar uma das amostras a seguir:

- ☐ cerca de 10 ml de urina
- ☐ escarro
- ☐ raspado de boca
- ☐ material citológico cérvico-vaginal (Papanicolaou)
- ☐ líquido biológico

c) O seu material coletado será armazenado e identificado com um código, garantindo que seu nome não seja divulgado.

d) É possível que você experimente algum desconforto relacionado com a coleta de material cérvico-vaginal, resultante da introdução de um instrumento denominado espéculo vaginal, usado para afastar as paredes da vagina e obter o material do colo do útero. No entanto, não haverá dor forte ou qualquer ferimento.

e) Se o material a ser coletado for líquido biológico, será realizado em ambiente ambulatorial, com anestesia. Seu material passará pelo Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Federal do Paraná, onde será(ão) realizado(s) o(s) exame(s) de rotina ao(s) qual(is) seu material biológico foi destinado e só então poderá ser utilizado nessa pesquisa.

f) Os benefícios esperados com essa pesquisa são: Melhor conhecimento da ação conservante de um líquido para exames de células e, conseqüentemente, melhora na qualidade desses exames, tornando os resultados mais confiáveis.

g) As pesquisadoras responsáveis por este estudo: Michelli Aparecida Bertolazo da Silva ([michelli.bertolazo@yahoo.com.br](mailto:michelli.bertolazo@yahoo.com.br)) e Prof. Dra. Maria Suely Soares Leonart ([msue@ufpr.br](mailto:msue@ufpr.br)) farmacêuticas, poderão ser contatados de segunda a sexta-feira, das 14 às 18h, no Laboratório de Citologia Clínica da Universidade Federal do Paraná, situado na Rua Lothário Meissner, 632 – Jardim Botânico, Curitiba – PR, ou pelos telefones (41) 3360-4084 ou 3360-4088, para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

h) A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento, sem nenhum tipo de penalização, e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado.

i) Todos os dados coletados serão mantidos de forma confidencial. Os dados coletados serão usados para a avaliação do estudo. Membros das Autoridades de Saúde ou do Comitê de Ética podem revisar os dados fornecidos. Os dados também podem ser usados em publicações científicas sobre o assunto pesquisado. Porém, sua identidade não será revelada em qualquer circunstância. Se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida.

j) As despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames laboratoriais) não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro.

l) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome.

m) O processamento de sua amostra biológica resultará em lâminas de citologia, que serão armazenadas no Laboratório de Citologia da UFPR e poderão ser utilizadas para estudos futuros, desde que pertinentes e devidamente aprovados em Comitê de Ética.

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa \_\_\_\_\_

Pesquisador Responsável \_\_\_\_\_

Orientador \_\_\_\_\_ Orientado \_\_\_\_\_

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR

Telefone:

(41)

3360-7259

e-mail:

cometica.saude@ufpr.br

Eu, \_\_\_\_\_ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento.

**Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo, e autorizo a coleta e uso do meu material citológico no estudo supracitado.**

\_\_\_\_\_  
(Assinatura do sujeito de pesquisa)

\_\_\_\_\_  
Local e data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa \_\_\_\_\_

Pesquisador Responsável \_\_\_\_\_

Orientador \_\_\_\_\_ Orientado \_\_\_\_\_

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR

Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br

**Declaração****Pesquisador(a) Responsável:** \_\_\_\_\_**Título da Pesquisa:** \_\_\_\_\_**Nº CEP/SD:** \_\_\_\_\_ **Nº CONEP/CAAE** \_\_\_\_\_**Instituição Co-Participante:** \_\_\_\_\_

Declaro ter lido e concordar com o parecer ético emitido pelo CEP da instituição proponente: Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, conhecer e cumprir as Resoluções Éticas Brasileiras, e em especial a Resolução CNS 196/96. Esta instituição está ciente de suas responsabilidades como instituição co-participante do projeto de pesquisa em tela, assim como do compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos de pesquisa nela recrutados, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem estar.

\_\_\_\_\_  
Assinatura e carimbo com nome do responsável institucional

Ou Assinatura e identificação contendo o cargo/função do responsável institucional

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR

Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br



## ANEXO2

### **SurePath® Collection - Documentação do produto (para utilização com o PREPSTAIN® System)**

REF 490522 REF 490527

Utilização Pretendida para Aplicações Ginecológicas. O conservante SurePath® Preservative Fluid (Fluido Conservante) (anteriormente designado CytoRich®) destina-se a ser utilizado com o PrepStain® System. O SurePath® Preservative Fluid (Fluido Conservante) é uma solução conservante à base de álcool, que serve como veículo de transporte, conservante e meio antibacteriano para amostras ginecológicas.

O SurePath® Preservative Fluid (Fluido Conservante) constitui um meio de colheita e transporte adequado a amostras ginecológicas testadas com Testes de ADN Amplificados BD ProbeTec™ Chlamydia trachomatis (CT) Qx e Neisseria gonorrhoeae (GC) Qx. Consulte os folhetos informáticos dos testes para obter instruções sobre a utilização do SurePath® Preservative Fluid na preparação de amostras para utilização com estes testes.

### **Limitações do Procedimento**

Utilize sempre boas técnicas de amostragem ao colher as amostras. Técnicas medíocres de colheita de amostras produzem preparações inadequadas. As amostras ginecológicas devem ser colhidas utilizando um dispositivo de amostragem do tipo escova ou um dispositivo de combinação escova/espátula plástica endocervical com cabeça(s) amovível(eis), de acordo com o procedimento de colheita padrão fornecido pelo fabricante. Não devem ser utilizadas espátulas de madeira com o PrepStain® System. Combinações escova/espátula plástica endocervical que não sejam amovíveis não devem ser empregues com o PrepStain® System. Um volume de  $8,0 \pm 0,5$  mL da amostra ginecológica recolhida no SurePath® Preservative Fluid Collection Vial (Frasco de Colheita de Fluidos Conservantes) é necessário para o processamento do teste SurePath® LBC no laboratório.

## Resumo e explicação do PrepStain® System

O PrepStain® System converte uma suspensão líquida de uma amostra de células cervicais numa camada fina e homogênea de células coradas de modo discreto, mantendo as células agrupadas para diagnóstico. 2–7, 9,10 O processo inclui preservação celular, amostragem aleatória, enriquecimento do material de diagnóstico, pipetagem, sedimentação, coloração e protecção com uma lamela, para criar uma lâmina SurePath® para utilização no rastreio e classificação citológica de rotina, conforme definido pelo sistema Bethesda.<sup>1,11</sup> A lâmina SurePath® apresenta uma bem preservada população de células coradas dispostas num círculo com 13 mm de diâmetro. O artefacto ligado à secagem ao ar, a presença de material estranho, bem como a sobreposição de matéria celular e de resíduos, são amplamente eliminados. O número de leucócitos é significativamente reduzido, permitindo uma mais fácil visualização das células epiteliais, das células relevantes para o diagnóstico e dos organismos infecciosos. O processo SurePath® inicia-se com a utilização, pelo pessoal médico qualificado, de um dispositivo de amostragem do tipo escova (p. ex., Cervex Brush® Rovers Medical Devices B.V., Oss - Países Baixos) ou uma escova/espátula plástica endocervical (p. ex., Cytobrush® Plus GT e espátula Pap Perfect®, Medscand (EUA) Inc., Trumbull, CT) com cabeça(s) amovível(eis), para colheita de uma amostra ginecológica. Em vez de espalhar as células colhidas pelos dispositivos de amostragem numa lâmina de vidro, as cabeças dos dispositivos de amostragem são destacadas do cabo e colocadas num frasco de conservante SurePath® Preservative Fluid (Fluido Conservante). O frasco é tapado, etiquetado e enviado com os documentos necessários para processamento no laboratório. As cabeças dos dispositivos de amostragem nunca são removidas do frasco de conservante que contém a amostra colhida. No laboratório, a amostra preservada é misturada por meio de vórtex\* e depois transferida para o reagente PrepStain® Density Reagent (Reagente de Densidade). Um passo de enriquecimento, que consiste na sedimentação centrífuga através do reagente Density Reagent, remove parcialmente da amostra os resíduos sem valor diagnóstico e as células inflamatórias em excesso. Após a centrifugação, as células agrupadas são novamente suspensas, misturadas e transferidas para uma câmara de incubação PrepStain® Settling Chamber (Câmara de Incubação) montada numa

lâmina previamente revestida SurePath® PreCoat (Previamente Revestida). As células sedimentam por gravidade e depois são coradas utilizando um procedimento de coloração de Papanicolaou modificado. A lâmina é limpa com xilol ou com um substituto de xilol e protegida com uma lamela. As células, dispostas num círculo de 13 mm de diâmetro, são examinadas ao microscópio por técnicos de citologia e patologistas com a formação adequada e com acesso a outras informações relevantes acerca dos antecedentes clínicos da paciente.

\*Nota: O frasco de colheita SurePath® Preservative Fluid Collection Vial (Frasco de Colheita de Fluidos Conservantes) dispõe de um volume suficiente para permitir a remoção de até 0,5 mL de mistura homogênea de células e fluidos para testes auxiliares, que antecedem o processamento do teste Pap SurePath® Pap Test, ao mesmo tempo que o volume restante é suficiente para a execução do teste Pap. A remoção de alíquotas pode ser executada após a passagem pelo vórtex no processo do teste SurePath® LBC. Consulte os folhetos informáticos do PrepStain® ou do Manual Method para obter instruções sobre a remoção de alíquotas.

## **Reagentes**

Para utilização em Diagnóstico In Vitro. Para utilização em laboratório apenas.

## **Advertências**

O conservante SurePath® Preservative Fluid (Fluido Conservante) contém uma solução aquosa de etanol desnaturado. A mistura contém pequenas quantidades de metanol e isopropanol. Não ingerir.

## **Precauções**

- Devem ser adoptadas boas práticas laboratoriais e todos os procedimentos para utilização do PrepStain® System devem ser rigorosamente respeitados.
- Evite salpicar ou gerar aerossóis. Os operadores devem utilizar equipamento protector adequado para as mãos, olhos e vestuário.
- O conservante SurePath® Preservative Fluid (Fluido Conservante) foi testado a nível da sua eficácia antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Aspergillus niger* e revelou ser eficaz. As amostras de SurePath® Preservative inoculadas com 10<sup>6</sup> CFU/ml de cada espécie não obtiveram qualquer crescimento

após 14 dias (28 dias no caso da *Mycobacterium tuberculosis*) de incubação em condições padrão. Contudo, devem ser sempre adoptadas precauções universais para o manuseamento seguro de fluidos biológicos.

### **Precauções gerais quanto aos teste auxiliares a partir do SurePath® Preservative Fluid Collection Vial (Frasco de Colheita de Fluidos Conservantes)**

Não havendo evidência de que a remoção de uma alíquota a partir do SurePath® Preservative Fluid Collection Vial (Frasco de Colheita de Fluidos Conservantes) afecta a qualidade da amostra para o teste citológico, poderão ocorrer raros casos de atribuição incorrecta de material de diagnóstico pertinente durante o processo. Os prestadores de cuidados de saúde poderão ter de adquirir uma nova amostra se os resultados não estiverem correlacionados com a história clínica do paciente. Além disso, a citologia aborda diferentes questões clínicas diferentes dos testes a doenças sexualmente transmitidas (DST); assim, a remoção da alíquota pode não ser adequada a todas as situações clínicas. Se necessário, deve ser recolhida uma amostra separada para testes de DST em vez de retirar uma alíquota do SurePath® Preservative Fluid Collection Vial (Frasco de Colheita de Fluidos Conservantes).

A remoção da alíquota de amostras de baixa celularidade poderá deixar material insuficiente no SurePath® Preservative Fluid Collection Vial (Frasco de Colheita de Fluidos Conservantes). A remoção da alíquota de amostras de baixa celularidade poderá deixar material insuficiente no SurePath® Preservative Fluid Collection Vial (Frasco de Colheita de Fluidos Conservantes) para preparação de um Teste Pap SurePath® Pap test satisfatório Fluidos Conservantes) para preparação de um Teste Pap SurePath® Pap test satisfatório.

### **Primeiros-socorros**

Consultar um médico de imediato. Em caso de ingestão, não induzir o vômito. Dar bastante água a beber. Nunca fazer ingerir nada a pessoas inconscientes. Em caso de inalação, levar o acidentado para local arejado. Em caso de contacto, lavar a pele e/ou os olhos imediata e abundantemente com água, durante pelo menos 15 minutos.

## CONSERVAÇÃO

Armazene o SurePath® Preservative Fluid (Fluido Conservante) sem amostras citológicas à temperatura ambiente (15° C a 30° C) nos frascos fornecidos. O SurePath® Preservative Fluid (Fluido Conservante) conserva células até um máximo de seis meses refrigerado (2° C a 10° C) ou até 4 semanas à temperatura ambiente (15° a 30° C). SurePath® Preservative Fluid (Fluido Conservante) que contém uma amostra citológica destinada a utilização com os Testes de ADN Amplificado BD ProbeTec™ CT Qx e GC Qx Amplified DNA Assays podem ser conservados e transportados durante um máximo de 30 dias a temperaturas entre 2° – 30° C antes de serem transferidas para os Tubos de Diluição de Amostras Citológicas de Base Líquida (LBC) para os testes de ADN BD ProbeTec™ Qx Amplified DNA Assays. Não utilizar o SurePath® Preservative Fluid (Fluido Conservante) depois de expirar a data de validade indicada no frasco.

## Colheita de Amostras Ginecológicas

Efectuar a colheita das amostras do modo habitual . Colheita de Amostras Utilizando o(s) Dispositivo(s) de Amostragem Cervical com Cabeça(s) Amovível(eis):

- 1 Colha uma amostra do colo do útero de acordo com o procedimento de colheita padrão fornecido pelo fabricante do(s) dispositivo(s) de amostragem.
- 2 Utilizando o polegar e o indicador da mão(s) enluvada, destaque a cabeça do dispositivo do cabo; insira a cabeça no frasco de colheita. Descarte o cabo do dispositivo de amostragem. Não toque na cabeça do(s) dispositivo(s).
- 3 Feche bem a tampa do frasco.
- 4 Envie o frasco contendo a(s) cabeça(s) do(s) dispositivo(s) de amostragem, com os documentos necessários, para o laboratório para processamento com o PrepStain®

## Garantia

Este produto oferece a garantia de desempenho conforme descrito na rotulagem e na literatura da TriPath Imaging, Inc. A TriPath Imaging rejeita qualquer garantia

implícita de comercialização ou adequação a qualquer outra finalidade e em caso algum é responsável por danos não consequenciais decorrentes da supramencionada garantia expressa.